T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PATATES VE İŞLENMİŞ PATATES ÜRÜNLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Beyhan DEMİRHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATATES VE İŞLENMİŞ PATATES ÜRÜNLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Beyhan DEMİRHAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

SAMSUN

2017

TEZ ONAYI

Beyhan DEMİRHAN tarafından hazırlanan **"Patates ve İşlenmiş Patates Ürünlerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarla İlgili Genetik Analizler"** adlı tez çalışması 29/12/2017 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Musa Kavas

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Sibel Yılmaz

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. …/…/2017

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki tüm bilgileri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü akademik ve etik kurallarına uygun olarak hazırladığımı, yer alan bütün bilgilerin doğru olduğununu, bilgilerin üretilmesi aşamasında yararlandığım bütün kaynakları referans olarak belirttiğimi beyan ederim.

29/12/2017

Beyhan DEMİRHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PATATES VE İŞLENMİŞ PATATES ÜRÜNLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Beyhan DEMİRHAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA

Günümüzde genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler konusunda tartışmalar devam etmesine karşın bu bitkilerin ekim alanları her geçen yıl artmaktadır. Son yıllarda genetik mühendisliği teknolojisi ile üretilen ürünler ve bu ürünlerden elde edilen gıdalar marketlerde yer almaktadır. Genetiği değiştirilmiş ürünlerin kullanımının uzun vade de çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri bilinemeyeceği için, kontrollü şekilde üretilerek tüketiciye sunulması yasal bir zorunluluktur.

Bu çalışmada Türkiye patates enstitülerinden temin edilen farklı genotipteki 16 adet yemeklik patates ve marketlerden satın alınan 5 adet işlenmiş patates ürünü, genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik olarak yabancı gen temeline dayalı genetik analizler yapıldı. Yabancı gen olarak Avrupa Birliğince onaylanmış ve pek çok transgenik üründe düzenleyici diziler olarak kullanılan 35S promotorü ve NOS terminatörü, *patatin* geni, higromisin direnç geni (*hpt*), ve *cry3A* geni kullanıldı. Bu dizilere ve genlere ait özgün primerler ile yapılan kalitatif PCR'a tabi tutuldu. Jel elektroforez sonuçlarına göre, bazı örneklerde *hpt* direnç geni ve sentetik *cry3A* geni büyüklüğünde bantlar tespit edildi.

Aralık 2017, 89 Sayfa

Anahtar kelimeler: GDO, PCR, Patates, İşlenmiş patates, 35S, NOS, *patatin*, *cry3A*, Higromisin.

ABSTRACT

Master Thesis

GENETIC ANALYSIS RELATED TO ORGANIZED GENETIC CHANGES IN POTATO AND PROCESSED POTATOES

Beyhan DEMİRHAN

Ondokuz Mayıs University
Institute of Science and Technology
Department of Molecular Biology and Genetics

Advisor: Assist. Assoc. Dr. Yilmaz KAYA

Despite the controversy about the plants with genetically modified plants today, the planting are as of these plants are increasing every year.In recent years, products produced with genetic engineering technology and food products obtained from these products are located in the markets.Since the use of genetically modified products in the long run can not be known about the environmental and human health effects, it is a legal requirement to produce them in a controlled manner.

In this study, 16 Turkey purchased from edible potatoes and store in different genotypes obtained from potato institute 5 pieces treated potato product for the detection of genetic changes in genetic analysis was performed on the basis of foreign genes.The 35S promoter and NOS terminator, the patatin gene, the hygromycin resistance gene (*hpt*), and the *cry3A* gene were used as foreign genes, approved in the European Union and used as regulatory sequences in many transgenic strains.These sequences and genetic primers were subjected to qualitative PCR. According to the results of gel electrophoresis, in some samples bands were detected in the size of *hpt* resistance gene and synthetic *cry3A* gene.

December 2017, 89 Page

Key words: GMO, PCR, Potato, Processed potato, 35S, NOS, *patatin*, *cry3A*, Hygromycin

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve destekleri ile katkıda bulunan değerli danışman hocam **Yrd.Doç. Dr. Yılmaz Kaya**'ya,

Üzerimde emeği geçen bölüm hocalarıma, tez jüri üyelerim **Doç. Dr. Musa Kavas** ve **Yrd. Doç. Dr. Sibel Yılmaz**'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan **Yunus Emre Arvas** ve **Mukaddes Durmuş** başta olmak üzere laboratuvarımızda çalışan diğer bütün araştırmacı arkadaşlarıma,

Öğrenimim boyunca bana göstermiş olduğumaddi ve manevi desteği için başta değerli eşim **İlhan Demirhan** olmak üzere tüm **aileme** en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Aralık, 2017 Beyhan Demirhan

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
Bç	Baz çifti
Bt	*Bacillus thuringiensis*
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (Karnabahar Mozaik Virüsü)
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift zincir DNA
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
dR	Delta reaksiyon (ısıma miktarı)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenligi Otoritesi)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim Bağlı İmmün Assay)
EPSPS	5-enolpurivilsikimat-3-fosfat sentaz
EURL	European Union Reference Laboratory (Avrupa Birligi Referans Laboratuvarı)
GD	Genetiği Değiştirilmiş
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GDB	Genetiği Değiştirilmiş Bitki
GS	Glutamin sentetaz
HCl	Hidroklorik asit
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements(Referans Materyaller ve Ölçüm Enstitüsü)

ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications(Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının KazanımlarıServisi)
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
Na_2EDTA	Disodyum etilendiamin tetra asetik asit
nm	Nanometre
Nos	Nopalin sentaz
O.D.	Optik yoğunluk
PAT	Fosfinotrisin asetiltransferaz
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PG	Poligalakturonaz
RNA	Ribonükleik asit
RR	RoundUp Ready
SRM	Sertifikalı Referans Materyal
TAE	Tris-Asetat-EDTA
T-DNA	Transfer DNA
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Teşkilatı

ŞEKİLLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun 2030'lu yıllarda sekiz buçuk milyarı geçmesi öngörülürken, bunun yaklaşık % 97' sinin gelişmekte olan ülkelerde oluşacağı düşünülmektedir (Economic, 2007). Dünya nüfusundaki bu hızlı artış bazı sorunları da beraberinde getirecektir. Bu sorunlardan en önemleri olarak, yeterli, dengeli ve sağlıklı olarak beslenememe,ülkeler arasında oluşabilecek ekonomik dengesizlikler ve doğal çevrenin zarar görmesi görülmektedir. Sürekli artan dünya nüfusunun beslenme sorununun giderilmesi için üst sınırlara ulaşan ekilebilir alanların genişletilmesinden ziyade birim alandan alınan ürün miktarının artırılması hususu önem taşımaktadır. Bunun için, günümüze kadar uygulanan klasik ıslah yöntemleri sayesinde bitkisel ürünlerin kalite ve miktarında,Yeşil Devrimle birlikte,önemli ölçüde başarılara ulaşılmıştır. Fakat, söz konusu ıslah yöntemleri ile istenilen sonuçlara ulaşmak uzun yıllar süren çalışmaları gerektirmiştir. Yüksek verimli tarım ürünlerinin üretiminin artırılmasında kullanılan klasik ıslah yöntemlerinin geliştirilmesi ve etkinliğinin artırılması amacıyla moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalar dünyada "Bitki Biyoteknolojisi" kavramını ortaya çıkmasına sebep olmuştur(Gözükırmızı, 2014).

Islah çalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmaya başlaması, ürün kalitesini arttırmaya yönelik çalışmaların tamamlanmasını sağlamıştır. Bitki klasik ıslah yöntemlerindezararlılara ve hastalık etmenlerine karşı kullanılan kimyasal ilaçlar, toprakta ve besin zincirinde uzun süre ayrışmadan kalmaktadır. Bu nedenle hayvan ve insan sağlığı ile çevre kirliliği açısından giderek artan bir tehdit kaynağı oluşturmaktadır. Bunlardan dolayı, bitkilere gen aktarma çalışmaları modern biyoteknoloji yöntemleri kullanılarak başlamış ve böyleceklasik ıslah yöntemleri ile kültür bitkilerine aktarılamayan genlerin aktarılması mümkün hale gelmiştir. Tarım ürünlerinde ekonomik önemi büyük olantarımsal biyoteknoloji ve genetiği değiştirilmiş organizmalar, klasik ıslah yöntemleri kullanılarak çözülemeyen problemlerin çözümü noktasında önemli katkılar sağlamıştır. Genetiği değiştirilmiş organizmaların sağlayacağı faydalara; besin değerlerinin zenginleştirilmesi, herbisit ve pestisitlerin kullanımının azaltılması, besinlerin neden olabileceği alerji gibi olumsuz etkilerinin azaltılması, birim alandan daha fazla verim elde edilmesi ve raf ömrünün uzatılması örnek gösterilebilir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların oluşturabileceği zararlarına; antibiyotiğe karşı direnç genlerinin doğaya dağılma ihtimali, alerjik reaksiyonlarında artma riski, doğal türlerdegenetik çeşitliliğin kaybı, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların çevreye salınımı sonucu doğal dengenin bozulması, virüslerden elde

edilen dayanıklılık genlerinin diğer virüslere geçerek virüslerde istenmeyen dayanıklılığın oluşmasından kaynaklanan riskler sayılabilir(Azadi ve Ho, 2010)

Yukarıda belirtilen riskler, sahip olunan biyolojik çeşitliliğin zamanla kaybolması endişesini doğurmuştur. “Birleşmiş Milletler Biyogüvenlik (Cartegana) Protokolü”, biyoteknoloji uygulamalarının neden olacağı problemlerin önüne geçilmesi ve biyolojik çeşitliliğin sürekli olarak korunmasına yönelik hazırlanmıştır. 2003 yılından beri bu protokol yürürlüktedir ve hukuki bir belge niteliği taşımaktadır. Bu protokol GDO’ların çevre ve insan sağlığına gelebilecek risklerin önlenebilmesine yönelik olarak hazırlanmış olup,bunların araştırılması aşamasından, çevreye salım ve transit aşamasına kadar geniş bir kapsama sahiptir. Buna göre; insan sağlığı üzerinde neden olabileceği olumsuz sonuçlar dikkate alınarak, biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik hazırlanmıştır. Genetiği değiştirilmiş canlı organizmaların tamamının ithalatı, ihracatı ve kullanılması için de geçerlidir (Kıvılcım, 2012).

Bu tez projesinin amacı, transgenik bitkilerin hemen hemen hepsinde düzenleyici diziler olarak kullanılan karnabahar mozaik virüsü 35S promotor (CaMV 35S),*Agrobacterium tumefaciens*’e ait nopalin sentaz (nos) terminatör, *patatin* geni,*cry3A*ve higromisin (*hptII)* direnç geni dizilerine özgü primerler ile DNA temelli metodlar kullanılarak; ülkemizde kullanılan patates ve marketlerinde satışı gerçekleştirilen işlenmiş patates ürünlerinde kalitatif PCR tekniklerine dayalı analiz yöntemleriyle DNA izolasyonu yapılıp, patates ve işlenmiş patates ürünlerinde DNA temelli yabancı gen analizleri yapılmasıdır.

Bu proje sonucunda elde edilen veriler ülkemizde GDO ile ilgili yapılan yasal düzenlemeleri kapsayan biyogüvenlik yasasının sağladığı yükümlülükler çerçevesinde değerlendirilip, marketlerde satışı gerçekleştirilen ürünlerin etiketlenmesi ve izlenmesi hakkında yol gösterici olacaktır.

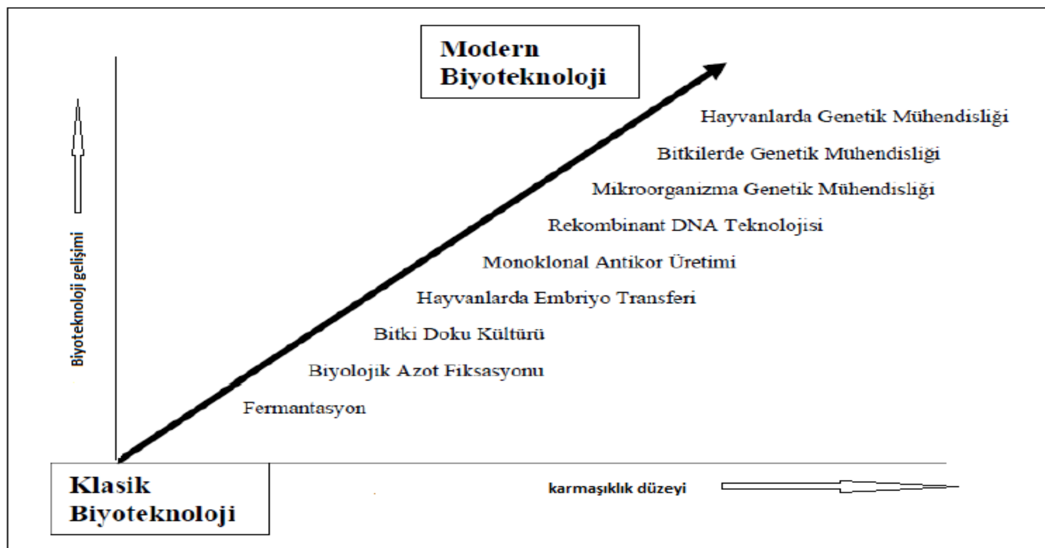
2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOTEKNOLOJİ

İlk defa 1919 yılında, Karl Ereky tarafından kullanılmış biyoteknoloji terimi;'Biyolojik sistemleri kullanarak hammaddelerin değiştirilerek veya işlenerek yeni ürünlere dönüştürülmesi' şeklinde tanımlanmıştır (Budd, 1991). Biyoteknoloji, modern bilgi ve teknolojilerin kullanımını gerektirmeyen ve insanlık tarihi boyunca deneme yanılma yoluyla geliştirilen klasik ya da geleneksel biyoteknoloji olarak adlandırılmaktadır (Aksoy, 2006).

Modern biyoteknoloji ise "rekombinant DNA, nükleik asitlerin hücre veya organellere doğrudan enjeksiyonu, farklı canlıgrupları arasında uygulanan, hücre füzyonu gibi tabii fizyolojik çoğalma ve rekombinasyon engellerini ortadan kaldırarak, klasik ıslah ve seleksiyon yöntemlerince kullanılmayan in vitro nükleik asit tekniklerinin tamamı" olarak tanımlanmaktadır(Haspolat, 2004). Bir çok bilim insanı tarafından 21. yüzyılın teknolojisi olarak kabul edilen modern biyoteknolojinin önemi ise, ulaştığı düzey, kapsadığı alanın genişliği ve kullandığı materyalin insan dahil tüm canlı organizmalar olmasından kaynaklanmaktadır (Soykan, 2007).

Geçmişi insanlık tarihine uzanan geleneksel biyoteknoloji, geçen elli senede moleküler biyoloji ve genetik alanlarında meydana gelen bilimsel ilerlemeler nedeniyle, bambaşka anlam ve önem kazanmıştır (Meriç, 2012). Şekil 2.1'de biyoteknolojinin gelişimi verilmiştir.



Şekil 2.1. Biyoteknolojinin gelişimi (Persley, 1990)

2.2. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR

İnsanoğlu tarihsel süreç içerisinde doğal seleksiyon ile insan müdahalesi olmadan gelişen canlıları ihtiyaçları dahilinde kullanmıştır. Eski Mısır ve Roma bölgelerinde olduğu gibi tarım ile geçim sağlayan insanlar en iyi verime sahip bitkilerin tohumlarını saklayarak bir sonraki yıl ekmeye başlamışlardır. Yüzyıllardır insanlar kendisine yararlı olan bitkileri ve hayvanları yetiştirmişlerdir.Dahasonraki zamanlarda geleneksel ıslah yöntemleri ile bazı bitkileri yetiştirilip, geliştirmiştir ve sonuncunda da daha fazla ürün elde edebilmişlerdir. Aynı zamanda inek, keçi gibi bazı hayvanları da evcilleştirerek bunlardan daha fazla faydalanmışlardır (Atsan ve Kaya, 2008).

İnsan nüfusu ikinci dünya savaşından sonra hızlı bir şekilde artmaya başlamıştır. Daha sonra Yeşil Devrim olarak adlandırılan dönemde (1965-1985) çok sınırlı alanlardan dahi çok daha fazla miktarda ve yüksek kalitede ürün alınabilmiştir. Yüksek verimin elde edilmesinin nedeni, geleneksel ıslah metotlarının gelişimi, tarımsal makinaların kullanımı, gübrelerin ve özellikle de sentetik gübrelerin tarımda kullanılmaya başlanılmasıdır. Aynı zamanda Yeşil Devrim ile bitki ve hayvan ıslah metotları da çok ileri seviyelere ulaşmıştır (Aydın, 2012).

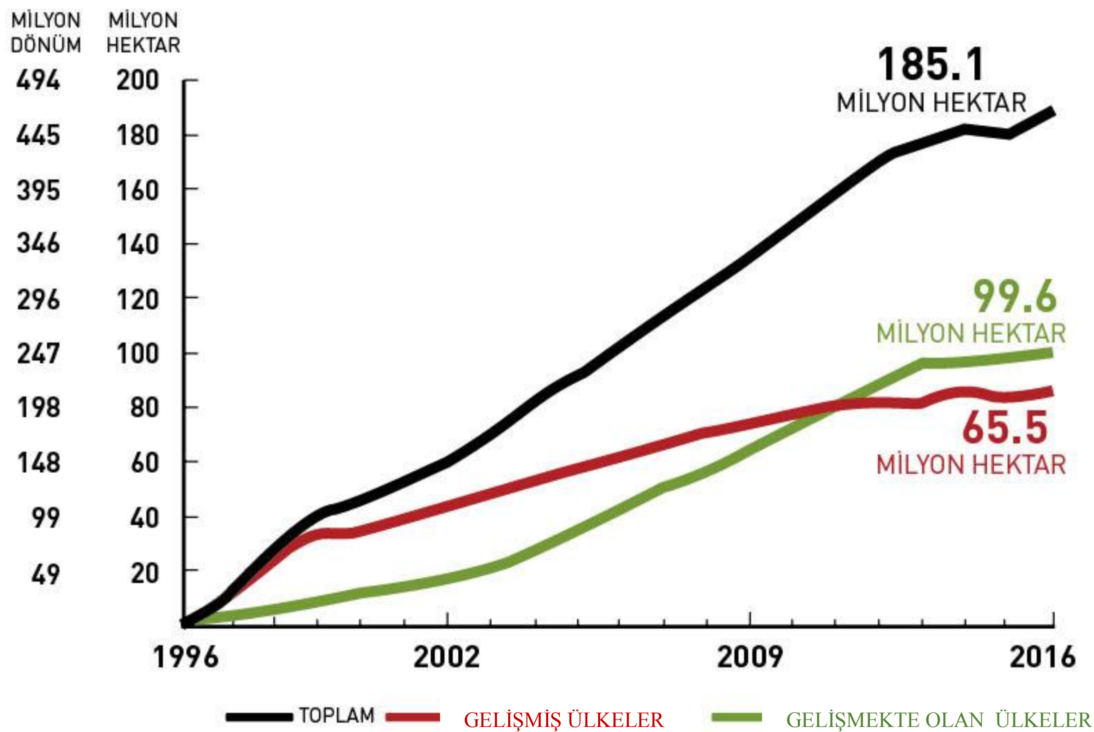
Zamanla dünya nüfusunun giderek artması ve tarımsal gereksinimlerin tam olarak karşılanamaması Yeşil Devrimi yetersiz kılmış ve insanoğlu giderek artan ihtiyaçlarından dolayı arayışlara başlanmıştır. Klasik ıslah yöntemleriyle yetiştirilenyeni ürünlerin çok zaman alması, yoğun bir iş gücünü ve masrafını da beraberinde getirmiştir. Bunlara ilave olarak, melezleme yapılabilecek türlerin de az olmasıyla klasik ıslah yöntemleri ihtiyaçları karşılayamaz duruma gelmiştir.Böylece biyoteknoloji ve genetik bilimlerinin ilerlemesiyle genetiği değiştirilmiş organizmalar hayatımıza girmeye başlamıştır (Kaya, 2015).

Bir organizmaya, rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak yeni bir genin transfer edilmesiyle oluşturulan canlıya Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO) denir. GDO'lar kendi cinslerinden bir gen taşıyabileceği gibi başka cins veyatürlerden gen ya da sentetik bir gen debarındırabilir. Örneğin domates bitkisine rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak bakteriden gen aktarılmasıyla genetiği değiştirilmiş domates elde edilebilir buna genetiği değiştirilmiş domates denir. Aynı şekilde muz bitkisine, kutuplarda yaşayan balıklara ait bir gen alınıp transfer edildiğinde genetiği değiştirilmiş muz ortaya çıkar (Kaya, 2015).

İlk olarak ABD'de çalışmaları başlayan genetiği değiştirilmiş organizmalar, 1973 yılında laboratuvar koşullarında ilk genetiği değiştirilmiş organizma elde edilmiştir. 1983 yılında ise dünyada ilk defa genetiği değiştirilmiş tütün bitkisi elde edilmiştir. 1995 yılında ise

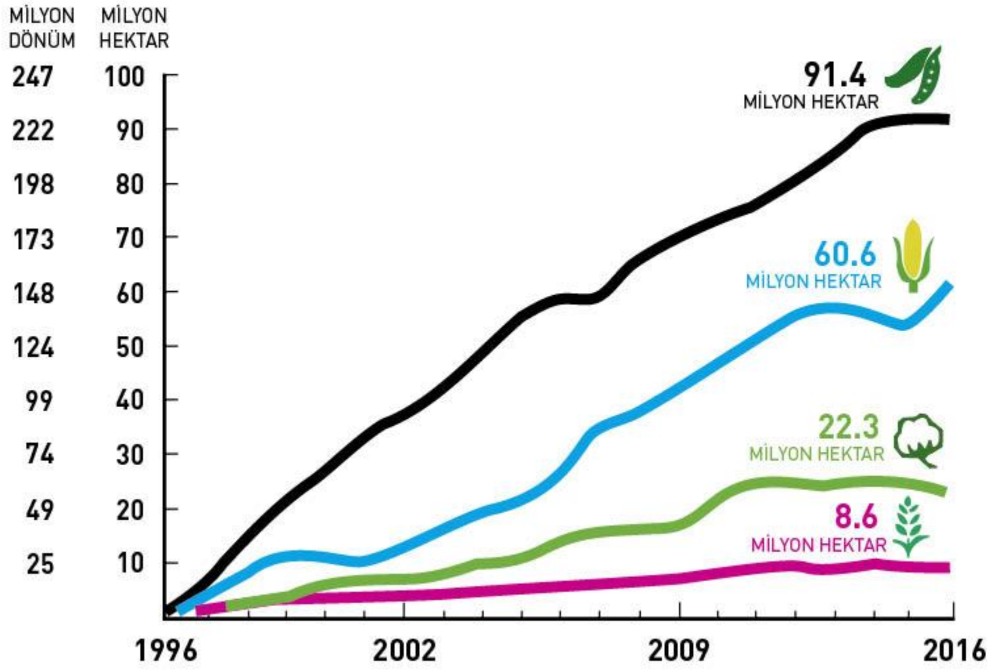
ilk defa “*Bacillus thuringensis*” bakterisinin genini barındıran, genetiği değiştirilmiş mısır bitkisinin açık alanda ekimi yapılmıştır. Ticareti yapılan genetiği değiştirilmiş ilk bitki domates bitkisidir.“FlavrSavr” adı verilen genetiği değiştirilmiş ilk domates daha uzun raf ömrüne sahip olmuştur. Daha sonraki senelerde ise ürün sayısı artarak devam etmiştir (Şen ve Altınkaynak, 2014).

Geçtiğimiz 20 yılda ekimi yapılan genetiği değiştirilmiş bitkisel ürün alanları giderek artmaktadır. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi dünya genelinde 1996 yılında 1,7 milyon hektar GDO ekimi yapılmışken,2016 yılında bu alan 185,1 milyon hektara ulaşmıştır.2016 yılı itibariyle sekiztanesi gelişmiş ülke olmak üzere toplamda 26 ülkede genetiği değiştirilmiş bitkilerin ekimi yapılmaktadır. Bu ürünlerin ekiminde yaklaşık18 milyon çiftçi çalışmaktadır (James, 2016).



Şekil 2.2. GDO’ların yıllara göre ekim alanları(James, 2016)

2016 yılı verilerine göreyeryüzünde miktar olarak en çok yetiştirilengenetiği değiştirilmiş ilk dört bitkinin ekim alanları azdan çoğa doğru kolza, pamuk, mısır ve soyadır (Şekil 2.3).



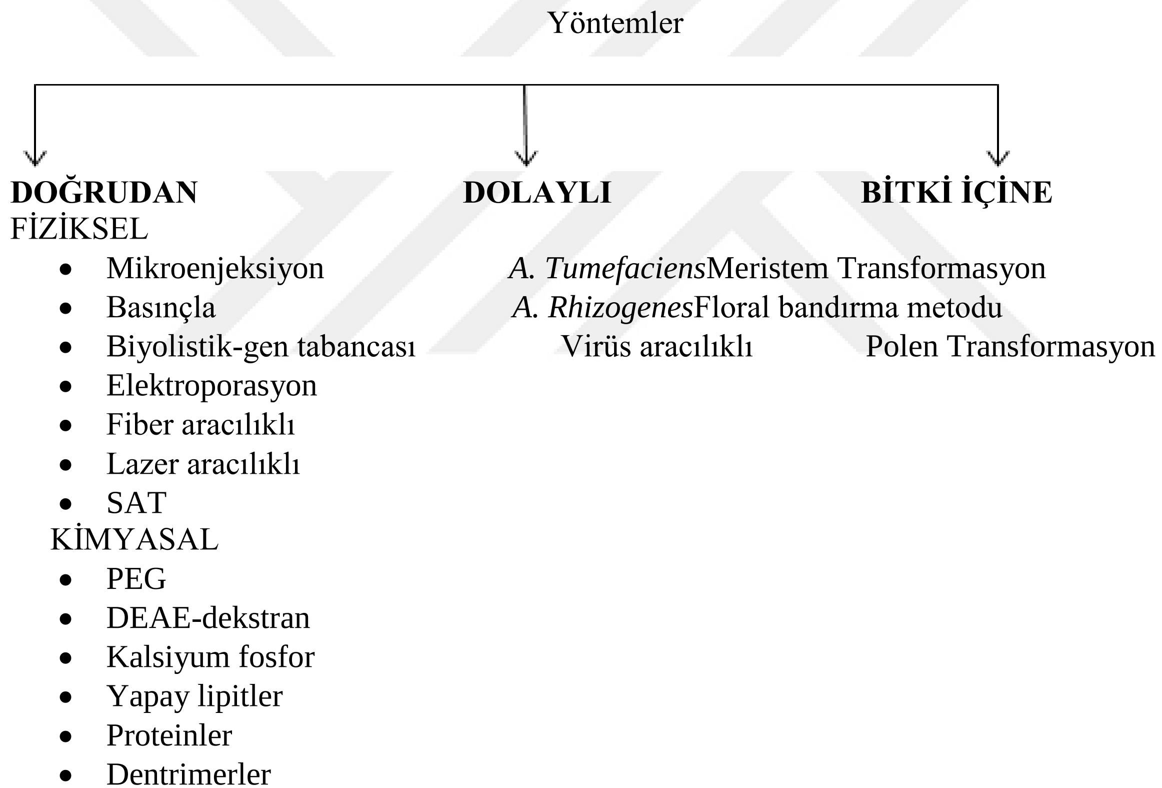
Şekil 2.3. Genetiği değiştirilmiş bazı bitkilerin yıllara göre değişen ekim alanları(James, 2016)

Ticareti konu olan soya, mısır, pamuk ve kanola gibi genetiği değiştirilmiş bitkiler ya bazı böceklere karşı dirençli ya da herbisit denilen yabacı ot ilaçlarına dayanıklı hale getirilmiştir. GDO üretimi karşıtlarının beyanlarına dayanarak, gazete ve televizyonda sürekli konu olan balık geni aktarılmış çilek, tavuk geni aktarılmış patates, kolera geni aktarılmış domates veya akrep geni aktarılmış pamuk dünyanın hiçbir ülkesinde yetiştirilmemektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların yol açtığı potansiyel zararlardan biri olan genetik kirlilik, genetiği değiştirilmiş bitkilerde bulunan yabancı genler özellikle arılar ve rüzgâr gibi etmenlerle birçok farklı ekosisteme rahatlıkla yayılmasıdır. Böylelikle organik ve klasik tarımın yapıldığı alanlara taşınarak arazideki bitkilerin DNA'sında bulaşmalara neden olmaktadır. Yararlı organizmalarda meydana getirdiği zararlara örnek olarak,sadece koçan kurtlarına karşı direnç gösterdiği söylenen *Bt* geni gösterilebilir. *Bt* geninin mısır bitkisine aktarılmasıyla elde edilen transgenik mısırbitkilerinin polenlerinin farklı yararlı kelebeklerin de ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Bu da doğal ekosistemin zarar görmesi demektir (Kaya, 2015; Topal, 2006).

2.3. BİTKİ HÜCRESİNE GEN AKTARIMINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Bitkilere gen aktarımı; dolaylı gen aktarımı ve doğrudan gen aktarımı olarak iki kategoride incelenmektedir. Dolaylı gen aktarımı; *Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium rhizogenes*, virüsler, RNAi, sperm aracılığı ile dolaysız gen aktarımı; biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, makroenjeksiyon, agro-enfeksiyon, polen transformasyonu, zigotik embriyoya DNA emdirilmesi, fiberler aracılığı ile DNA aktarımı, sonikasyon, desikasyon, elektroforez ve mikrolazer yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Gözükırmızı, 2008; Primrose ve Twyman, 2013).

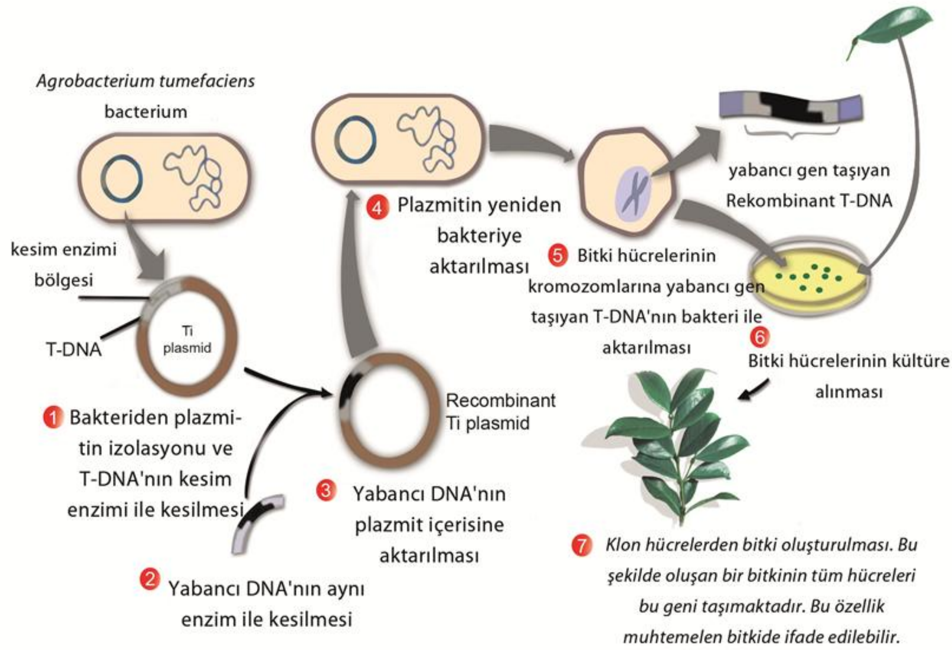
Çizelge 2.1. Bitki transformasyon yöntemleri (Erzincanlı, 2006)' dan faydalanılarak yazar tarafından çizilmiştir



2.3.1. *Agrobacterium*Aracılığıyla Gen Transferi

Günümüzde en fazla uygulanan tekniktir. *Agrobacterium, Rhizobiaceae* familyasından, toprakta yaşayan gram negatif bir bakteridir. Çift çenekli bitkilerde *A. tumafaciens* kök boğazı tümörüne, *A. rhizogenez* ise saçak kök oluşumuna sebep olmaktadır. Tümör oluşumuna bazı monokotil bitkilerde de rastlanmaktadır. *Agrobacterium* bakterilerinde tümör oluşumu ve opin

sentezi, bakteride bulunan Ti-plazmitinin üzerindeki hareketli DNA parçası (T-DNA) ile ilişkilidir (De La Riva vd, 1998; Watson vd, 1975; Zaenen vd, 1974). *Agrobacterium*Ti-plazmitinde bulunan T-DNA bölgesi çıkartılıp yerine yerleştirilen DNA parçasının da bitki hücresine aktarılabilindiğini yapılan çalışmalar göstermiştir. Böylece plazmid üzerindeki tümör genlerin T-DNA bölgesinden restriksiyon enzimleri ile çıkarılmasının bitki hücresine gen aktarımını engellemediği belirlenmiştir (Leemans vd, 1982). Çeşitli kaynaklardan izole edilen tarımsal öneme sahip genler T-DNA bölgesine yerleştirilip, bitki doku ve hücreleri bu Agrobacterium hatlarıyla enfekte edilirse istenilen özellikleri taşıyan genler bitki hücrelerine aktarılmış olur. *Agrobacterium* aracılı transformasyon mekanizması şekil 2.4'te göstermektedir.



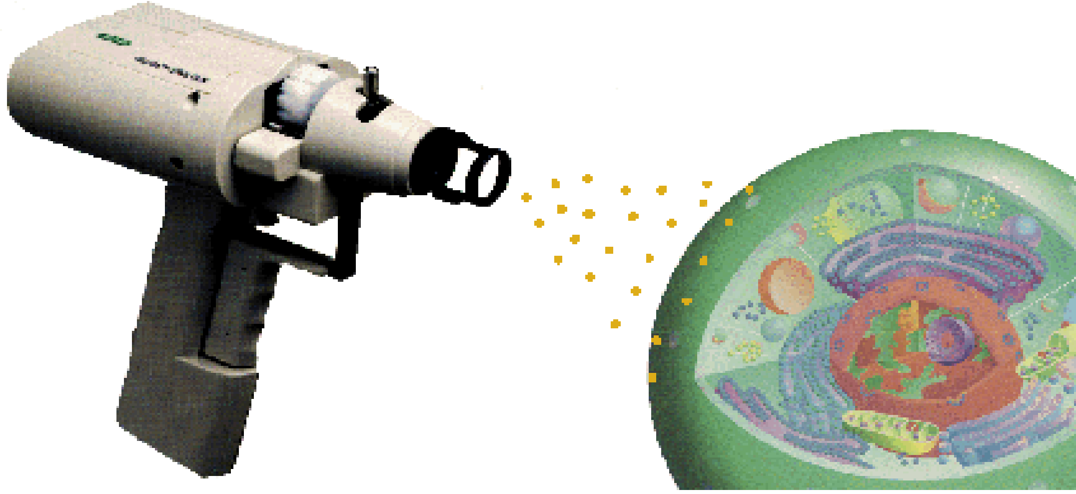
Şekil 2.4. *Agrobacterium tumafaciens* aracılığıyla gen aktarımı(Arvas, 2017)

Agrobacterium sisteminin sadece çift çeneklileri doğal olarak enfekte etmesi nedeniyle uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda tek çeneklilere gen aktarımında kullanılması oldukça sınırlı kalmıştır (Tzfira ve Citovsky, 2006). Bu durumun aşılabilmesi için biyolistik, elektroporasyon, protoplast füzyonu ve mikroenjeksiyon gibi alternatif doğrudan gen aktarımı yöntemleri geliştirilmiştir (Arı, 2004). Gen aktarımında kullanılan bu ve bunun gibi başka teknikler tarımda yeni özelilkte bitkilerin geliştirilmesinde sınırsız olanaklar sunmaktadır.

Gen aktarımı sırasında, sadece protein kodlayan bölge aktarılmaz. Bunun yanında transgenlerin yüksek düzeyde anlatım yapması ve anlatımının kontrol edilmesi için, geni düzenleyici diziler olan promotor ve terminatör bölgeleri içeren, ‘gen kaseti’ olarak adlandırılan sentetik yapılar şeklinde de aktarılırlar. RNA polimerazın tanıyıp bağlanabileceği, transkripsiyonu başlatan promotor ve transkripsiyonu sonlandıran terminatör bölgeleri, gen anlatımının lokasyonunu ve seviyesini de kontrol edebilmektedir (Michelini vd, 2008). Günümüzde, yüksek transkripsiyon aktivitesinden dolayı CaMV’ye (Karnabahar Mozaik Virüsü) ait konstitütif bir promotor olan 35S ve sonlandırıcı dizi olarak *Agrobacterium tumefaciens*’e ait NOS terminatörü birçok transgenik bitkide kullanılmaktadır. Ayrıca, gen aktarımı çalışmalarında DNA kasetlerinde antibiyotiğe direnç geni gibi işaret genler de yerleştirilerek transformantların yabancı DNA’yı almamış dokulardan/hücrelerden ayırt edilebilmesi sağlanır (Elenis vd, 2008).

2.1.2. Biyolistik Gen Transferi (Partikül Tabancası ile Gen Aktarımı)

Spermidinle 1-2 μm altın veya tungsten partiküllerine tutturulmuş DNA parçalarının bitki hücre ve dokularına helyum gazı şokuyla bombardımanı şeklinde yapılan bir tekniktir. Bu metotla, DNA parçası yerine doğrudan faj, bakteri veya maya hücreleri hedef dokuya transfer edilebilmektedir. Bununla birlikte, bu teknik, yüksek moleküler ağırlıklı DNA transferinde, DNA izolasyonunda ve saflaştırılmasında da kullanılabilmektedir (Babaoğlu, 1999; Gözükırmızı, 2008; Primrose ve Twyman, 2013).Özellikle buğday, arpa, pirinç, çavdar gibi tahıl cinsi bitkilere gen aktarımı için kullanılan bir diğer yöntem ise “gen tabancası”dır. Gen tabancaları, üzerlerinde genleri taşıyan mikro boyutlarda tungsten, gümüş ya da altın gibi metalleri mermi gibi ateşleyip, bitki dokularına aktararak genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin elde edilmesinde kullanılırlar (Arı, 2004).



Şekil 2.5. Partikül tabancası(Arı, 2011)

2.3.3. Protoplastlara Direk Gen transferi (Elektroporasyon ve PEG Aracılığıyla Transformasyon)

Hücre protoplast zarı üzerinde DNA moleküllerinin geçebileceği büyüklükte (30 nm) geçici gözenekler oluşturularak aktarılmak istenen DNA parçasının hücreye girmesini sağlamayı amaçlayan bir tekniktir. Bu teknik için, yüksek voltajlı elektrik akımı veya kimyasal maddeler (% 15-25 PEG: polietilen glikol) kullanılmaktadır (Babaoğlu, 1999; Primrose ve Twyman, 2013).

2.3.4. Mikro Enjeksiyon

Bu yöntemin temel prensibi, aktarılmak istenen DNA parçası kılcal pipetler (0.5-10 µm çapında) veya enjektörler aracılığı ile hedef hücre içine transfer edilmesidir (Arslan ve Akyüz, 2009).

2.3.5. Sonikasyon

Hücreler arası ve hücre zarında DNA parçalarının hücre içine girişini sağlayacak boşluklar açmak hedeflenmektedir bunun için ses dalgaları kullanılmaktadır. Bu yöntem ile pancar bitkisinin protoplastlarından başarılı sonuçlar alınmıştır (Babaoğlu, 1999; Primrose ve Twyman, 2013).

2.3.6. Lazer Mikro Işınlarıyla Transformasyon

Bu yöntemde hücre zarında boşluklar açmayı amaçlayan yöntemlerle aynı yolu izlemekte ancak boşlukları açmak için UV lazer mikro ışınları (343 nm) kullanılmaktadır (Babaoğlu, 1999; Primrose ve Twyman, 2013).

2.3.7. Silikon Karbit Fiberleri ile Transformasyon

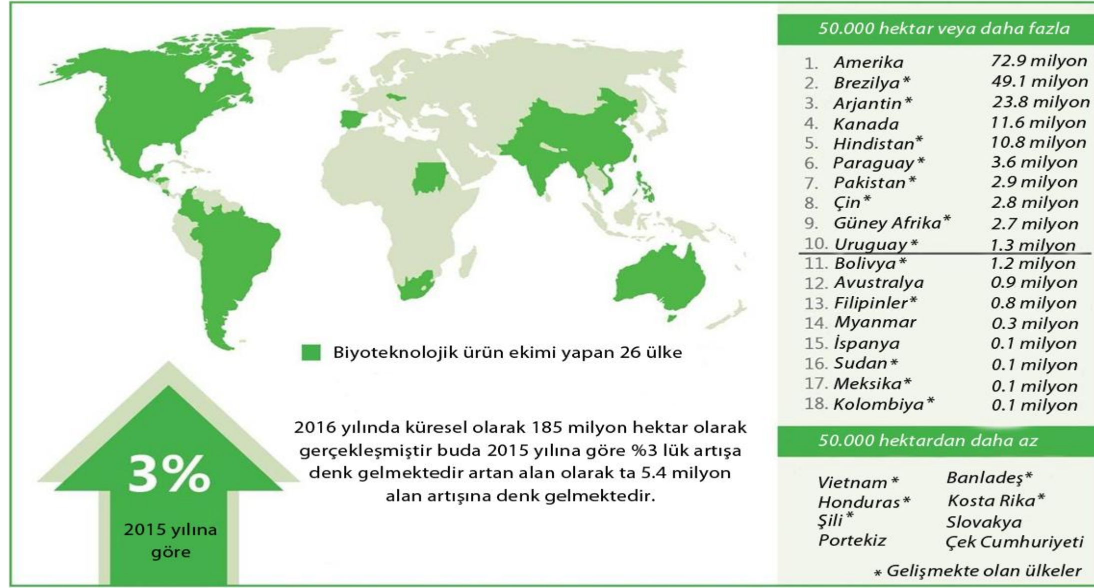
Çok başarılı alınamayan bir yöntem olmasına rağmen, prensibi hücrelerde küçük delikler açmaya dayanmaktadır. Bu amaçla DNA silikon karbit fiberlerle kaplanmakta ve fiberler hücre zarında ince delikler açarak DNA'nın içeriye girmesini sağlamaktadır (Babaoğlu, 1999; Primrose ve Twyman, 2013).

2.4. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLER

Genetiği değiştirilmiş (GD) bir ürünün geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi birçok basamaktan oluşan, çok uzun yıllar alan bir süreçtir. GD ürünün gelişim sürecinde ürünün kalitesinin bütünlüğünün korunması GD ürünün tanımlanması, etiketlenmesi ve her aşamada izlenebilirliği için etkili araçların geliştirilmesi yeni bir GD ürününün başarısı için zincirin esas bileşenlerini oluşturmaktadır (Gupta ve Ram, 2004). Bu zorlu süreçlere rağmen ilk kez 18 Mayıs 1994'te genetiği değiştirilmiş domatesin ticaretine başlanmıştır(Kramer ve Redenbaugh, 1994). Flavr Savr^{tm} ticari adıyla piyasaya sürülen domateste poli-galaktronaz (pg) enziminin sentezini düzenleyen bir antisens RNA kullanılmıştır (Sheehy, 1987). PG enzimi meyvenin olgunlaşması esnasında pektin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimdir. Olgun domateste en bol bulunan proteindir ve meyvenin olgunlaşmasından sorumludur (Brady vd, 1985; Hobson, 1965). *PG* geninin anlatımını azaltacak bir antisens RNA yöntemi, olgunlaşan domateste pektin üretiminin düşmesine neden olduğundan domates uzun süre taze kalabilmektedir.

İlk defa piyasaya GD ürün çıktıktan sonra, dünyada yeni ve hızla büyüyen bir sektör oluşmaya başlamış ve GD tohumların ekildiği tarım alanları olarak artmıştır. Şekil 2.6'te görüldüğü gibi 1996-2016 yılları arasında GD ürünlerin üretimi yaklaşık 100 kat artarak toplam üretim alanı 185,1 milyon hektara ulaşmıştır. Bu nedenle GDO'lar son zamanlarda tarım alanlarına en hızlı uyum gösteren teknolojik ürünler olarak görülmektedir. 2016 yılındatransgenik ürün ekimi yapan 26 ülkenin, 18'inin gelişmekte olan, kalan 8'inin ise gelişmiş ülkeler olduğu belirtilmiştir (James, 2016). 31 ülke GD ürünleri ithal etmiş ve

bunlarla birlikte toplam 60 ülke yasal düzenlemelere bağlı olarak GD ürünlerin üretimini ve/veya ithalatını kabul etmiştir.

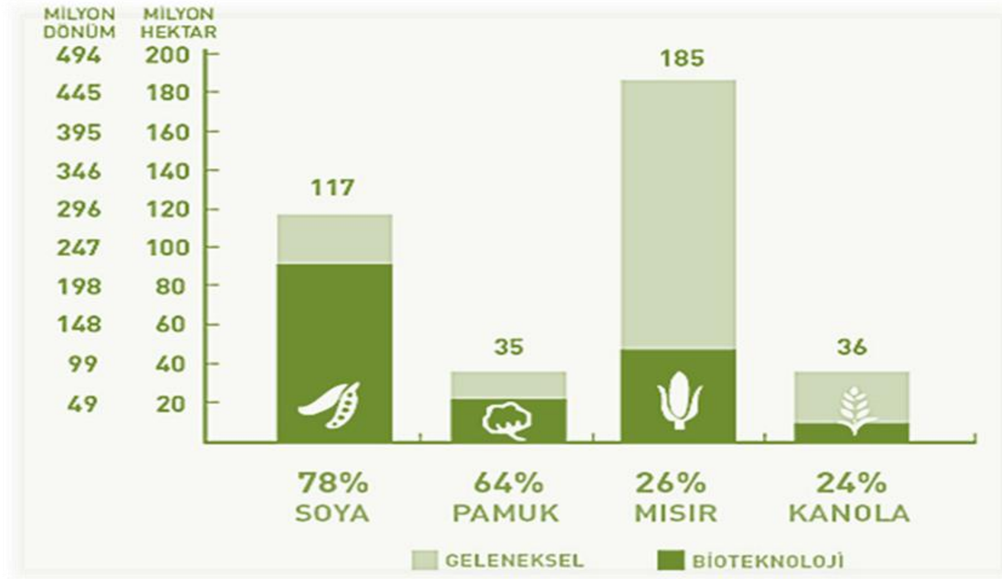


Şekil2.6. Dünyada enfazla GDO üreten yirmi altı ülkenin sıralaması(James, 2016)

GDO ekim alanı 2016 yılında 1 milyon hektarı aşmış ilk 10 ülke şöyledir. ABD (72.9 milyon hektar) Brezilya (49.1 milyon hektar) Arjantin (23.8) Kanada (11.6) Hindistan (10.8) Paraguay (3.6), Pakistan (2.9), Çin (2.8), G.Afrika (2.7), Uruguay (1.3), geri kalan 16 ülke ise ekim alanı büyüklüklerine göre sıralanışı Bolivya, Avustralya, Filipinler, Myanmar, İspanya, Sudan, Meksika, Kolombiya, Vietnam, Honduras, Şili, Portekiz, Bangladeş, Kosta Rika, Slovakya ve Çek Cumhuriyeti'dir.

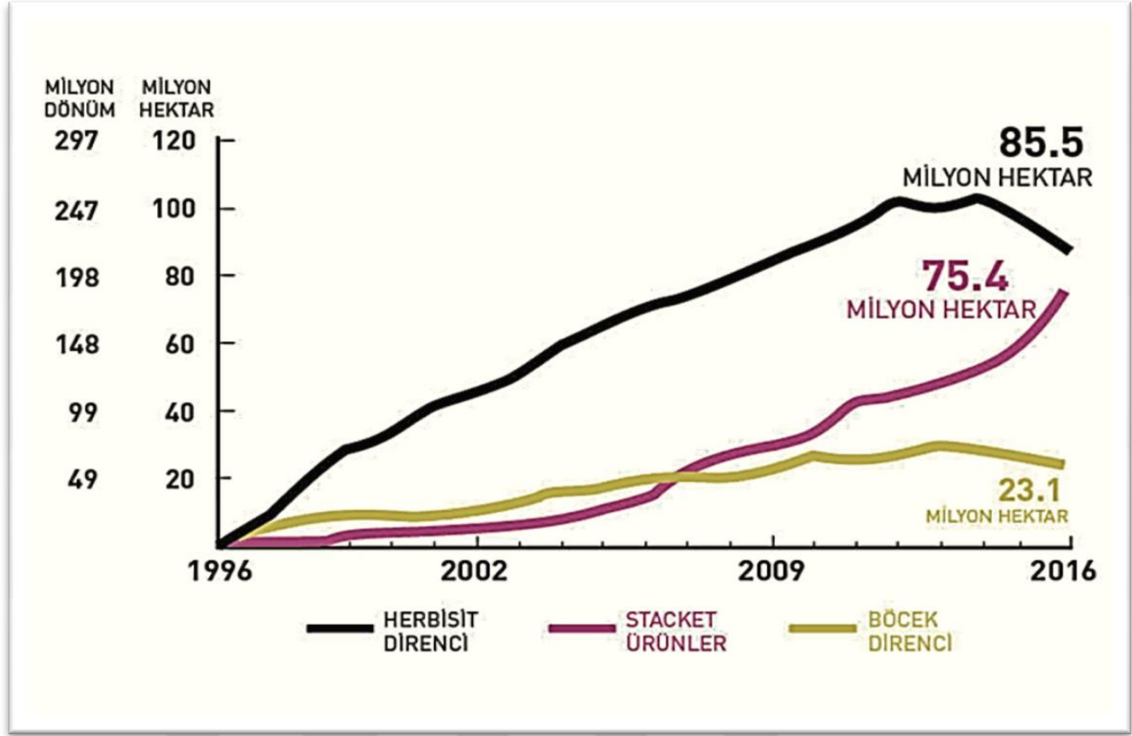
ISAAA (Uluslar Arası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımı Servisi) raporuna göre son 10 yıllık süreçte GD bitkilerden en fazla üretilen ve üretimi en fazla artan ürün soyadır. Soya, 75,4 milyon hektarla küresel transgenik ürün ekim alanının % 47'sini oluşturmaktadır. İkinci sırada 51 milyon hektarla mısır (% 32) , üçüncü sırada 24.7 milyon hektarla pamuk (% 15), dördüncü sırada 8.2 milyon hektarla kanola (% 5) gelmektedir.

2016 yılı verilerine göre yeryüzünde üretilen her 100 soyanın 78'i biyoteknolojik bir üründür, pamukta ise 100 pamuktan 64'ü biyoteknolojik üründür. Mısırda ise her 100 üründen 26'sı biyoteknolojik ürün olup bunların yanı sıra patates, balkabağı, ayçiçeği, yer fıstığı gibi bitkisel ürünlerin transgenik ürün çeşitlerininde olduğu bilinmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Transgenik ürünlerin küresel üretim miktar (James, 2016)

Herbisite dirençli çeşitler, 93,9 milyon hektarlık ekim alanı ile GD bitkiler arasında % 59'luk bir paya sahip olarak lider durumdadır. 2016 yılında kombine ("stacked") ürünler 75.4 milyon hektarla, 185.1 milyon hektar olan küresel ekim alanının % 41'ini oluşturmaktadır. İki veya daha fazla özelliği bir arada bulunduran kombine ürünler (genellikle herbisit toleransı+böcek direnci), 23,1 milyon hektarlık ekim alanına sahip böcek dirençli varyetelerden daha geniş alanda ekimi yapılmış ve 2015-2016 yılları arasında hızlı oranda artış gösteren transgenik ürünler olmuştur (ISAAA, 2016).



Şekil 2.8. Herbisitlere karşı toleransın yıllara göre değişimi (James, 2016)

2.5. BİRİNCİ NESİL GD BİTKİLERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

İlk yıllarda GD ürünlerinin ticarileştirilmesiçalışmaları; herbisit toleransı, böcek ve patojen direnci gibi doğrudan çiftçiyi ilgilendiren yani girdiye yönelik, tarım bitkilerinin yetiştirilmesine yardımcı olan özelliklere odaklanmıştır. Başka bir deyişle Birinci Nesil GDO'ların çiftçinin kâr oranını ve ürün verimini artırılması hedeflenmiştir (Korth, 2008b). Herbisit toleransının yaygın olarak kazandırılması, çiftçilerin üretim maliyetlerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Ayrıca *Bacillus thuringensis* (*Bt*) endotoksinini şifreleyen gen aktarılarak elde edilen mısır ve pamuk yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda, ürün verimini etkileyen zararlı tırtıllara karşı bitkilerin üretimininde pestisit kullanımı azalmaktadır.Bu sayede üretim maliyet ve veriminin artışının yanında kimyasal ilaçların çevre ve insan sağlığına etkileri ortadan kaldırılacaktır.

2.5.1. Herbisitlere Dayanıklılık

Herbisit, tarım alanlarında yetiştirilen kültür bitkisilerine zarar veren yabancı otları öldürmek veya gelişimini durdurmak için kullanılan kimyasallara verilen genel isimdir. Herbisitler, belli morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip istenmeyen otları seçerek öldürmektedir. Gen

aktarımı yoluyla herbisitlere karşı kazandırılan dayanıklılık genellikle iki farklı mekanizmayla ele alınabilir. Birinci olarak,bitkiye tolerans sağlamak amacıyla herbisitlerin etki ettiği alan herbisitin zarar veremeyeceği şekilde değiştirilir. Diğer mekanizma ise herbisitlerdeki etkin maddeyi inaktif hale getiren proteinlerin şifrelendiği dayanıklılık genleri yerkeştirilerek dayanıklılığın kazandırılmasıdır. Bu dayanıklılık genleri ya mikroorganizmalardan ya da doğal olarak bu genleri barındıran dayanıklı bitkilerden izole edilmektedir. Şekil 2.8' de verilen değerlere bakıldığında herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılan GDO'lar her geçen gün artmıştır.

Genel olarak herbisitler, bitkinin hayatta kalması için gerekli olan metabolik yolları hedefleyerek çalışır. Yabancı otlarla kimyasal mücadelede kullanılan herbisitin seçiciliği ve toksisitesi önemli parametrelerdir (Öktem, 2004). Bu bağlamda, en etkili herbisitler arasında yer alan glifosat ve glifosata direnç özelliği kazandırılmış transgenik bitkiler tarım alanlarında yaygın olarak yetiştirilmektedir.

2.5.2.Strese Dayanıklılık

Çevreden kaynaklanan strese maruz kalan bitkiler kendilerini korumak için stratejiler geliştirirler. Sıcaklık, soğuk, su eksikliği, yüksek tuzluluk veya ağır metallere karşı yüksek toleransın bitkilere kazandırılması bitkilerin marjinal tarım alanlarında yetiştirilmesini mümkün kılacaktır. Strese karşı yüksek bir tolerans kazandırılması, antioksidanların oluşumunu sağlayan enzimleri kodlayan genlerin aktive edilmesiyle sağlanmaktadır. Tütün bitkisine *(Nicotiana tabacum) Mangan-SOD* geninin aktarılması ile ozon zararı 3-4 kat azaltılabilmiştir (Hoffmann, 1997). Bunun yanı sıra trehalozun anlatımını yapan *trehaloz sentaz* geni (*TPS*) mısır ve tütünbitkisine aktarılması sonucu dayanıklı hatlar elde edilmiştir (Zhang vd, 2005). Soğuk stresine karşı tolerans arttırmak için seçilen genler kloroplast membranlarınıyağlar ile doyurulmasını sağlamıştır. Kabak bitkisinden, tütün bitkisine aktarılan gliserol-3-fosfat-asiltransferaz oluşumundan sorumlu genin soğuğa karşı tolerans sağlaması örnek olarak verilebilir (Moon vd, 1995). Ayrıca, *Pseudopleuronectes americanus* balığında bulunan antifiriz proteinini şifreleyen *AFP* geninin domates ve tütün bitkilerine aktarılmasıyla dona karşı dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir (Nottingham, 2003). *Athrobacter globiformi'*den *Arabidopsis*'e *Cholinoxigenaz* geninin aktarılması ile bitkilerde glisin betainlerinin birikerek tuza karşı dayanıklılığın artması sağlamıştır.

2.5.3.Hastalıklara Tolerans

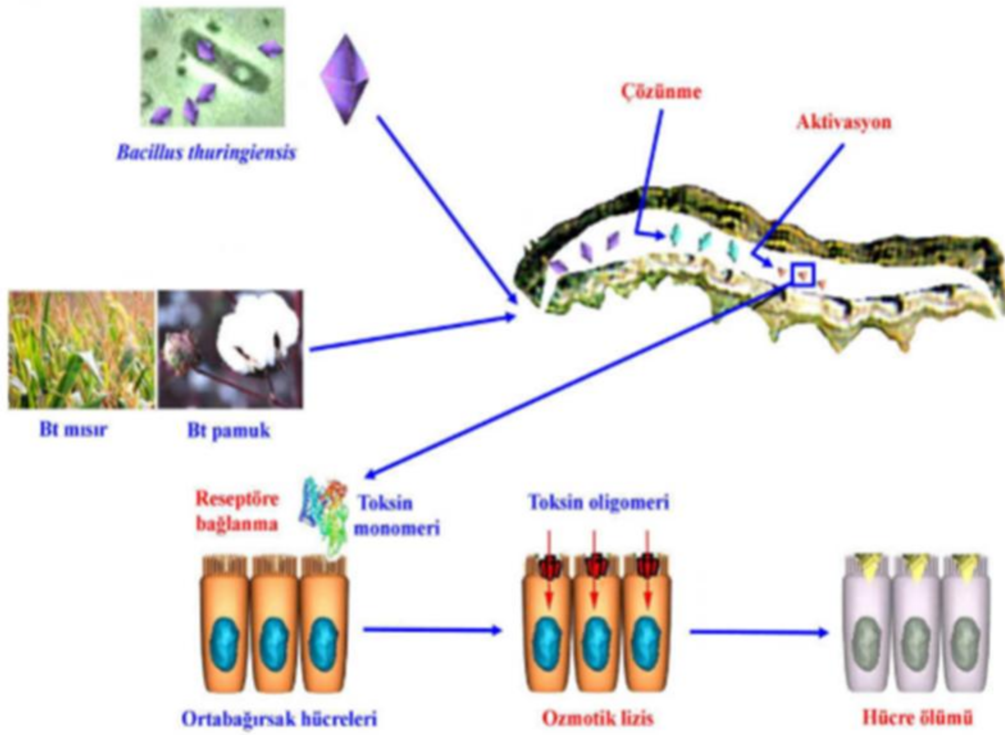
Bitkiler patojenik reaksiyonları sınırlandırmak için teşvik edilebilenfarklı savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bunların arasında hücre duvarlarının ligninleşmesi, küçük antibiyotik moleküllerin üretilmesi, yaralanmış bölgedeki konukçu hücrelerin ölmesi ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi sayılabilir. Virüsler, bakteriler, mantarlar ve nametotlara karşı sistematik olarak edinilen dayanıklılık çok sayıdaki dayanıklılık geninin birlikteçalışması ile ortaya çıkmaktadır. Virüsler, mantarlar ve bakteriler özellikle meyveler ve sebzelerde büyük zararlar yaparlar. Virüsler, bir bitkiden başka bir bitkiye bulaşmak için böcek gibi aracılara ihtiyaç duyduğundan bunlara karşı daha çok dolaylı yollarla mücadele yapılmaktadır. Mantar ve bakterilerin bitkilere bulaşması olayında konukçu-patojen ilişkisinin ön plana çıkması nedeniyle dayanıklılığın gen teknolojisi kullanılarak kazandırılması, böcek ve virüslere göre daha az başarılı olmuştur (Kempken, 2004).

2.5.4.Zararlılara Dayanıklılık

Böcekler, bitki dokularına mekanik zarar vermenin yanında mantar, bakteri ve virüs gibi patojen hastalıklara da sebep olmaktadırlar (Demir vd, 2006). Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal yöntemler için uygulanan girişimlerde harcanan büyük miktarlarda para ve emeğe karşın, oluşan kayıpların önlenememesi nedeniyle, gen teknolojisi yöntemleri kullanılarak farklı mücadele yolları tercih edilmektedir. Tarımsal biyoteknoloji alanında gerçekleşen gelişmeler sayesinde zararlılarla mücadelede etkili gen teknolojisi yöntemleri kullanılabilmektedir. Bu mücadele yöntemleri, böcekler üzerinde toksik etki yapan proteinlerin (insektisidal proteinler) sentezinden sorumlu genlerin bitkilere aktarılarak transgenik bitkilerin geliştirilmesi esasına dayanmaktadır (Öktem, 2004). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan genler, gram pozitif bir toprak bakterisi olan *Bacillus thuringensis*'in δ-endotoksin proteinlerinin (*Bt*) sentezinden sorumlu olan *cry* genleridir. Bt endotoksin proteinlerinin doğal böcek öldürücü etkinliği, çoğu zaman yararlı kuş, böcekler, balıklar ve memeliler üzerinde seçicilik özelliği olmayan toksik etkiler oluşturan sentetik kimyasal böcek öldürücülere göre alternatif oluşturmaktadır.

Bt gibi toksik proteinleri şifreleyen *cry* genleri adını, spor oluşturma döneminde bakterinin içinde oluşan kristal inkluzyonlarından alır. Bu kristaller çoğunlukla birden fazla sayıda spesifik *cry* gen ürünü içerir. *Cry* geni tarafından şifrelenen Bt proteinleri toksik hale gelmeden önce, protoksinler olarak bulunur ve böceğin sindirim sisteminde aktifleşmeleri

gerekir. Kristaller toksine duyarlı bir böceğin sindirim sistemine girdikleri zaman, orta bağırsağın pH'sının 8'den büyük olduğu alkali ortamında eriyerek parçalanır. Bu aşamada Bt protoksin proteinlerinin uçları, bağırsaktaki özel proteaz enzimleri tarafından kesilerek toksik proteini ortaya çıkar. Daha sonra aktif protein, böceğin orta bağırsak membrandaki özel protein reseptörlerine bağlanır. Reseptörlere bağlanan aktif Bt toksini böceğin hücre zarından girerken çok sayıda proteinlerin birleşmesiyle hücre zarındaporlar oluşur (Korth, 2008a). Porların oluşumu, zardan iyon geçişine neden olduğundan zar ozmotik lizise uğrar ve parçalanır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9.*Cry*toksinlerininetki mekanizması (Demir vd, 2012)

2.6.İKİNCİ NESİL GD BİTKİLERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

Tüketicilerin kullanımına yönelik geliştirilmiş bitkisel ürünler olan ikinci nesil GDO'lar piyasada henüz çok yaygın değildir. Biyoteknoloji teknikleri aracılığıyla bitkilerin besin değerlerini değiştirmek veya geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalar devam etmektedir. "Altın pirinç" adı verilen, içerdiği beta karoten/A vitamini arttırılmış çeltik ikincinesil GDO'lara verilebilecek en popüler örnektir ancak henüz ticarileşmemiştir. İlaç ham maddesi ve monoklonal antikor üretimi de ikinci nesil transgenik bitkilerin potansiyel kullanım alanına

girmektedir. Bu amaç doğrultusunda hepatit-B yüzey antijeni aktarılmış patates ve muz bitkilerinin sera ve tarla denemeleri yapılmıştır (Korth, 2008b).

2.6.1.Kimyasal İçeriğin Değiştirilmesi

Besin maddelerinin içeriğini değiştirmekteki amaç, ürünlerin içeriğini oluşturan maddeleri beslenme ve yenilebilir gıdalar bakımındandaha uygun yapılara dönüştürülerek bu maddeleri içermeyen ya da az oranda içeren bitkilere aktararak zenginleştirmektir.

İnsan sağlığı bakımından önem arz eden mineral maddeler vitaminler ve vücut için önemli olan elementler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yeterince alınamamaktadır. Günümüzde besleyici içeriği değiştirilerek zenginleştirilen GDO'lara en iyi bir örnek olarak "altın pirinç" (golden rice) verilebilir. Beta karoten üretmesi beklenen tohum hücreleri için pirinç bitkisinin genomuna, beta karoten sentezinde anahtar rolü olan genlerin aktarılması sağlanmıştır. İçeriği zenginleştirilen buürünün taneleri parlak sarı-yeşil renkte olduğu için de bu pirince "altın pirinç" adı verilmiştir (Schaub vd, 2005). Renkli meyvelerde bolca bulunan, doğal bir bitki pigmenti olan beta-karoten, havuçta ve yeşil sebzelerde de bulunmaktadır.

Yetersiz beslenme sonucunda A Vitamini eksikliği ölümcül hastalıklara neden olabilmektedir. ISAAA-2015 raporuna göre tahmini 190-250 milyon çocuk A vitamini eksikliğinden kaynaklanan hastalıklar bakımından risk altında bulunmaktadır. Bu insanların temel besini olan pirince gen transferi yöntemi ile A vitamini öncüsü olan Beta Karoten miktarının arttırılmasıyla gerçekleşmiştir (ISAAA, 2016).

2.6.2. Kalite İyileştirme

Kalite iyileştirme adına yapılan ilk transgenik çalışmalar, ürünlerin depolanma süresini ve dayanıklılığını artırma amacıyla olgunlaşma süresinin değiştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Olgunlaşma süresi bitkilerdeki etilen oranının düşürülmesi ile geciktirilebilmektedir. Etilen oranının azaltılması domates kökenli *aminosiklopropan-karboksilatsentaz 27* (*ACC*) geni ile başarılmıştır. Olgunlaşma süresi ile ilgili diğer bir yöntem piyasaya sürülen ilk transgenik bitki Flavr Savr domatesinde denenmiş, antisens RNA teknolojisi kullanılarak poligalakturonaz (PG) enziminin gen anlatımı düzenlenmiştir (Sheehy, 1987). Meyvenin olgunlaşması sırasında PG enzimi pektin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimdir, olgun domates meyvesinde en bol bulunan proteindir (Brady vd, 1985; Hobson, 1965). PG geninin anlatımını azaltacak antisens RNA teknolojisi, olgunlaşan domateste pektin yıkımını azaltarak domatesin daha uzun süre taze kalması sağlanır (Kramer vd, 1992).

2.6.3.Raf Ömrü ve Organaoleptik Kalitenin Artırılması

Flavr Savr, olgunlaşma, yumuşama ve çürüme işlemleri geciktirilerek uzun bir raf ömrüne sahip olmalarını sağlamak amacıyla genetiği değiştirilmiş ilk domates bitkisidir (Uzogara, 2000). Olgunlaşma ve yumuşama, büyük oranda, meyve hücreleri tarafından etilen üretimine bağlıdır. İşlemi, etilen üretiminde rol oynayan genlerin kontrol edimesiyle veya farklı bir strateji olarak hücre duvarını bozan bir enzim olan poligalakturonaz enziminin baskılanarak pektin yıkımının ertelenmesiyle sebze ve meyvelerin olgunlaşması geciktirilmiştir (Uzogara, 2000). Böylece koku, lezzet, yumuşaklık/sertlik derecesi gibi organoleptik özellikler meyve ve sebzelere kazandırılarakdaha uzun raf ömrü sağlanabilmektedir. Bu ürünlerin nakliye ve işlenmeye dayanıklı olması, soğutma sistemlerinin güvensiz, pahalı ve nakliye ağının yetersizliği düşünülürse gelişmekte olan ülkelerdeki çiftçiler ve tüketiciler için de çok faydalı olacaktır (Korkut ve Soysal, 2013).

2.7. ÜÇÜNCÜ NESİL GDBİTKİLERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

Üçüncü Nesil GDO'lar insan sağlığı için önemli olan ve pahallıelde edilen ilaç aşılarının aktarıldığı, biyoyakıt üretiminde kullanılan daha verimli bitkiler olarak tanımlanır. Henüz AR-GE çalışmaları devam eden üçüncü nesil GDO'lar yakın zamanda olumlu neticeler verip üretim aşamasına geçeceği belirtilmektedir (Çetiner, 2010).

2.7.1. Bitkilerde Aşı Üretimi

GDO'lar hem gıda olarak hem de ilaç olarak tüketilebilirler. Örneğin; çayın flavonoid içeriğini, brokolinin anti-oksidant içeriğini zenginleştirmek mümkün olabilir. Patates, domates vemuz bitkilerinin aşı depolamak için genetiği değiştirilebilir. Özellikle olgunlaştığı zaman çiğ olarak tüketilen muz gibi bazı tropikal ürünler; kuduz, hepatit, dizanteri, ishal ve kolera ile diğer bağırsak enfeksiyonlarına karşı kullanılabilen proteinleri üretmek için genetiği değiştirilebilmektedir. Yenilebilir ürünlerdeki bu aşılar, ürünlerin yetiştirildiği, düşük maliyetle dağıtıldığı ve özellikle aşı üretimi için kaynağın ve tıbbi alt yapının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkeler göz önüne alındığında çocuklar için faydalı olacaktır (Çelik ve Balık, 2016; Uzogara, 2000)

Hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) üreten transgenik tütün ve patates bitkileri ABD'de biyoteknolojik yöntemler kullanarak elde edilmiştir. Farelere yedirilen patates yumrularının da farelerin savunma sistemlerini uyardığı belirlenmiştir. Bu gibi çalışmalar gelişmekte olan

ülkelerde yaygın olarak üretilen ve taze olarak tüketilen muz bitkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Hepatit B hastalığında olduğu gibi bu konuda yoğun çalışmalar kızamık, çocuk felci, difteri, kuduz ve viral hastalıklara karşı kullanılan aşıların da bitkilerden üretimi konusunda yoğun çalışmalar devam etmektedir (Özcan ve Sancak, 2015).

Bu aşılar, hem pasif hem de aktif bağışıklık kazandırmaya uygun olup, organ nakli sonrası tedavide de kullanılabilmektedirler. Bu yolla üretilen aşılar, hayvansal sistemlerdeki üretilenlere göre patojenlerle (örneğin AIDS veya Hepatit virüsleri, BSE ve toksinler) bulaşma tehlikesi daha azdır (Demir vd, 2006). Ayrıca ağızdan uygulanabilen aşıların üretim maliyeti daha düşüktür. Zira aşılar bitki besinleri ile beraber alınabilmekte ve aşı esnasında kullanılması gerekli maddelerin izolasyonu ve temizlenmesine gerek kalmamaktadır. Bir diğer avantajı da farmakolojik maddelerin doğrudan mevcut tarımsal üretim sürecine entegre edilebilmesidir. Önümüzdeki yıllarda insanlar çok düşük fiyatla taze olarak tükettikleri meyvelerle, sebzelerle veya onlardan elde edilen aşılarla aşılanabileceklerdir (Ergin ve Yaman, 2013).

2.7.2.Biyoyakıt Üretimi

Nüfus artışının beraberinde getirdiği enerji probleminin aşılması adına mısır, sorgum, kanola, soya ve ayçiçeği gibi yağ bitkilerinden biyogaz, biyodizel ve etanol üreterek geleneksel fosil yakıtlara alternatif yakıt kaynaklarının oluşturulması üzerine yapılan çalışmalar devam etmektedir. Her geçen gün önemini daha yoğun olarak hissettiğimiz biyo-yakıtların yakın bir gelecekte bitkiler üzerinden çok daha ucuza ve bol miktarda üretilebileceği belirtilmektedir.

Son yıllarda birçok ülke artan enerji fiyatlarının bütçeye yükünün azaltılması amacı ile biyoyakıt üretimine yönelmiştir. Biyoyakıt üretimini teşvik eden diğer bir önemli etken ise enerji arz güvenliğinin sağlanmasıdır. Biyoyakıtların tarihçesine bakıldığında ilk ortaya çıkan ve kullanılan biyoyakıtın biyodizel olduğu görülmektedir. Biyodizel; ham maddesi kanola, ayçiçeği, soya, aspir, pamuk gibi yağlı tohumlu bitkilerden elde edilen bitkisel yağlar ile hayvansal atık yağlar olan ve motorinle çalışan araçlarda yakıt maddesi olarak kullanılabilen bir biyoyakıt çeşididir. Biyoetanol, arpa, buğday, mısır, şeker pancarı, şeker kamışı, patates ve odunsular gibi kimyasal içeriğinde nişasta, şeker ve selüloz maddelerini içeren bitkilerin kullanıldığı ve benzinle çalışan taşıtlarda yakıt olarak kullanılabilen bir biyoyakıt çeşididir (Hatunoğlu, 2010).

2.8.GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLERİN ETKİLERİ

Günümüze kadar biyolojik çeşitliliğin korunmasında biyoteknoloji çok önemli rol oynamıştır. Bitki genetik kaynakları açısından bakıldığı zaman klasik koruma yöntemlerinin kullanılamadığı inatçı (recalcitrant) tohumlu türlerin (meşe, kestane), tohumla üretilmesinde problem olan türlerin (orkide, süs bitkileri), vejatatif yolla çoğalanların (meyve ağaçları), doku kültürleri biyoteknoloji kullanılarak yapılabilmektedir. Bunun yanında ultra soğuk koşullarda koruma; DNA'nın korunması, polen koruma gibi uygulamalar da biyoteknoloji kullanılarak gerçekleşmektedir. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak yapılan melezleme çalışmaları, çeşitliliğin artmasına ve türlerin genetik çeşitliliğin anlaşılmasına da imkan sağlamaktadır. Ayrıca marker destekli seleksiyon çalışmaları yabani akrabalarda bulunan hedef genlerin kültür çeşitlerine aktarılmasını sağlar (Karagöz, 2010).

Sıralanan bu yönleriyle biyoteknoloji, bitkilerin genetik kaynaklarının korunması sürdürülebilir tarım için vazgeçilmez bir araçtır. Endemik tür sayısında ülkemiz oldukça zengin olduğundan dolayı genetiği değiştirilmiş bitkilerin olumsuz etkilerini en aza indirmek için önlemlerimizi artırmalıyız.

2.8.1. Çevre ve Biyolojik Çeşitliliğe Etkileri

Çevre açısından ciddi tehlikelerden biri, genetiği değiştirilmiş bitkilerin çevreye salınımını takiben doğal türlerde genetik çeşitliliğin kaybına, ekosistemdeki tür dağılımının ve dengenin bozularak genetik kaynakları oluşturan yabani türlerin doğal evolüsyondan sapmalarına neden olabileceği düşüncesidir. Bu açıdan gen kaynakları tehdit altına girmiştir. Genetiği değiştirilmiş bitki türleri ile rekabete yenik düşen doğal türlerin hızla kaybolması genetik çeşitliliğin yanı sıra biyolojik çeşitliliği de tehdit etmektedir. Dünya yüzeyindeki karasal biyoçeşitliliğin yaklaşık % 80'inin gen aktarımı teknolojisi için gereken hammaddeleri sağlayabilen ülkelerde olması ise bu tehdidi daha da artırmaktadır (Yanaz, 2003).

Bitkiler arasında gen alışverişi hayvanlara göre daha kolay olduğundan, genetiği değiştirilmiş bitkilerin barındırdığı en önemli risklerden biri gen kaçışıdır (Tüysüzoğlu ve Gülsaçan, 2004). Çevreciler, genetiği değiştirilmiş ürünlerin geniş alanlarda ekimi yapıldığı takdirde çevresel riskler oluşturabileceği konusunda kaygı duymaktadırlar (Uzogara, 2000). Genetiği değiştirilmiş bitkiler, doğal türlerle rekabete girerek onların yok olmasına da neden olabilir (Zülal, 2003). Ayrıca, bitkilere kazandırılan genetik özelliklerin çapraz tozlaşma esnasında doğal ve yabani türlere ya da böceklere kaçışı da söz konusu olabilir. Herbisitlere

dayanıklılık veya böcek öldürücü toksin üretmek üzere bitkilere aktarılan genlerin çapraz tozlaşma ile yabani türlere geçmesi durumunda dayanıklı süper yabani türler oluşabilir (Fagan ve John, 2005; Tüysüzoğlu ve Gülsaçan, 2004; Zülal, 2003).

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin biyolojik çeşitlilik üzerine etkilerindenen önemli konulardan biri de "Terminatör" gen teknolojisidir. Bu durumda, yeni genlerin toprak bakterilerine geçmesi ya da terminatör geni aktif duruma getirmek için kullanılan bazı sentetik ilaçlar neticesinde dayanıklı yeni bakteri türlerinin ortaya çıkma olasılığı kaygı uyandırmaktadır (Yılmaz, 2014).

Dünyada GDO'lu ekim alanlarının artmasıyla birlikte oluşabilecek bir diğer endişe de yer altı suları ve akarsuların kirlenmesi ile toprağın zarar görmesidir. Bu nedenle toprakta yaşayan canlılara rekombinant gen kaçışı olabileceği iddia edilmektedir ve bunun örneklerinin görüldüğü ifade edilmiştir (Şehirali ve Özgen, 1988).



Şekil 2.10. GDO'ların biyoçeşitlilik üzerine etkileri (Özdemir, 2007)'den faydalanılarak yazar tarafından oluşturulmuştur

2.8.2. Sağlık Üzerine Etkileri

İnsan sağlığına GDO'lu gıdaların etkileri arasında, antibiyotiklere karşı direnç, alerjik reaksiyonların tetiklenmesi, toksisite, artan doğum anomalileri sayılabilir. Bunlardan, alerji ileantibiyotik direnci kesinleşmiş yan etkiler olarak belirtilmekle birlikte, kanser vb. kronik hastalıklar ile sakat ve ölü doğumlar gibi uzun dönemde ortaya çıkabilecek etkilere yönelik net bir bilgi bulunmamaktadır (Yılmaz, 2014).

Alerji: Biyoteknolojik ile üretilmiş besinlerin, bir ürünün alerjik proteinini kodlayan geninin bir başka ürüne transferi ile zaten alerjik olduğu bilinen bir besinin bu özelliği daha da artabilir veya yeni alerjik proteinler ortaya çıkabilir. Bu alerji oluşturma durumuna bir örnek olarak 1996 yılında Brezilya kestanesinden soya fasulyesine aktarılan *2S* genini içeren ürünler alerjiye neden olması sebebiyle marketlerden toplatılmıştır. Bunadan başka 2000 yılında, *Bt* geninin mısıra aktarılmasıyla elde edilen koçan kurduna dayanıklı StarLink transgenik mısır çeşidi de alerjiye sebebiyet verdiği için toplatılarak yalnızca hayvan yemi olarak kullanılmasına izin verilmiştir (Özgen vd, 2007). Genetiği değiştirilmiş gıdalarda uygulanan alerji testlerinde alerjen etki gösterdiği bilinen GDO'lu ürünlerde bulunup bulunmadığına yönelik test çalışmaları yapılır. FAO, GDO'lar için gen aktarımının tamamen kontrollü bir süreç olmadığını, aktarılan genin; konakta birleşme, açığa çıkarma veya durağanlaşma yoluyla farklı sonuçlara yol açabileceğini bildirmektedir. GDO'ya yerleştirilen genin konakçının genom bütünlüğünde oluşturabileceği etkiler henüz belirlenemediğinden oluşabilecek alerjenlerin açığa çıkma riski göz ardı edilmemelidir (Aslan ve Şengelen, 2010).

Toksik maddeler: Transgenik ürünler, aktarılan genleri ve onlardan kaynaklanan sekonder metabolitleri yapısında bulundurduğu için, potansiyel bir toksisiteye sahiptir. Konuyla ilgili temel iddialardan birisi genlerin bağımsız, tek başına çalışmadığı ve bir canlıya aktarılan genin ya da genlerin beklenmeyen ve istenmeyen yan etkilerinin olabileceğidir. Genetiği değiştirilmiş organizmalara aktarılmış olan transgenin ekspresyonu ve genetik fonksiyonu tahmin edilemeyecek değişimlere yol açabilir. Böylece transgenin protein ürünü, beklenmeyen reaksiyonların ve potansiyel toksinlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Ayrıca aktarılan genler genom üzerinde toksin üretimini durduran düzenleme bölgesini bozması aşırı toksin ekspresyonu ile sonuçlanabilir. Bakterilere yapılan gen aktarımıyla proteaz inhibitörleri, kasava ve lima fasulyesindeki siyanojenler, kanola türlerindeki guatrojenler ve muzdaki presör aminleri gibi doğal toksin genleri açığa çıkabilir ve yanlışlıkla bu toksinlerin düzeyinde artışa neden olabilir (Çelik ve Balık, 2016).

Antibiyotik Direnci: GD bitkilerle ilgili risklerden bir tanesi de antibiyotiğe dirençliliği sağlayan işaret genleridir. *A. tumefaciens* aracılığıyla veya doğrudan gen aktarım yöntemlerinde gen transfer edilen hücrelerin ve bu hücrelerden gelişen bitkilerin seçilebilmesi için işaret genleri kullanılmaktadır. Bu işaret genleri genellikle bakteriyel kökenli olup, bitki hücre ve dokularını antibiyotiğe dirençli hale getirirler. Böylece doku kültürü çalışmalarında besinyerlere antibiyotik veya herbisitler ilave edildiğinde, gen aktarımı yapılan hücre ve bitkiler kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. *Neomycin fosfotransferaz II* gibi antibiyotiğe

dirençliliği sağlayan genler çok kullanılır. Bunlar alerjik olabileceği gibi kültür bitkilerinden insan sindirim sistemindeki bakterilere ulaşarak onları da dirençli hale getirebilmektedirler (Anonymous, 2007).

Özetle, antibiyotiğe direnç genlerinin bitkilere aktarılması, bitkileri tüketen canlıların sağlığı açısından tehlike arz edebilmektedir, çünkü bu genlerin ürünü tüketen canlıda bulunan bakterilere yatay gen transferiyle geçerek bu bakterilerin de antibiyotik direncikazanmasına yol açabilmekte, buna bağlı olarak antibiyotiklerin de hastalık yapan bakterilere karşı etkisi azalmaktadır (Anonim, 2014).

2.8.3. Sosyo - Ekonomik Üzerine Etkileri

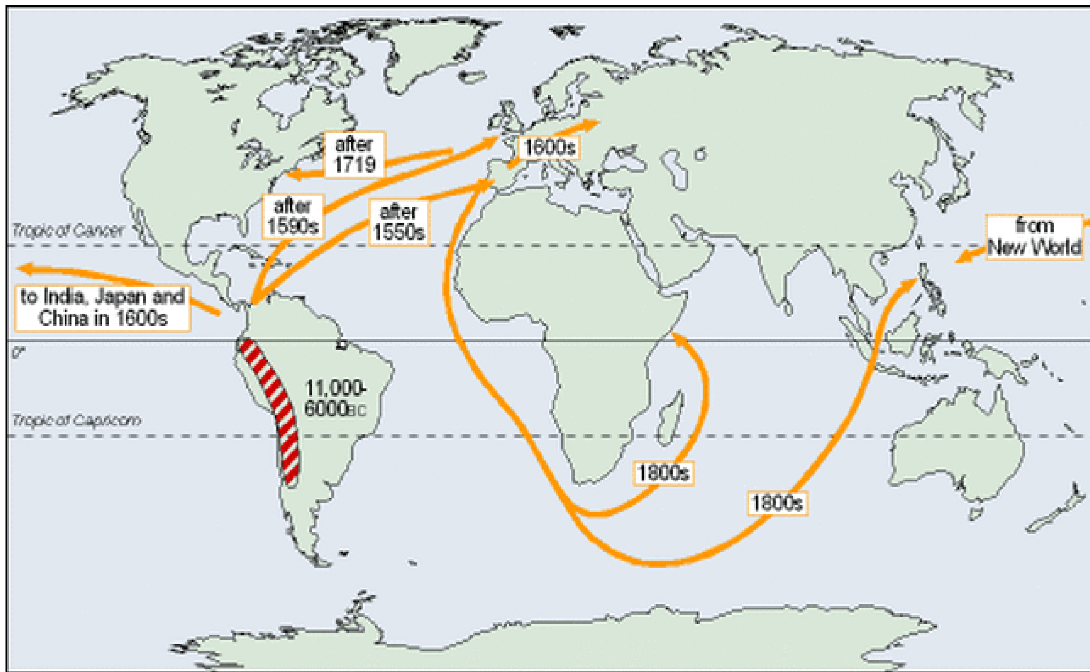
Bitkisel üretimin transgenik çeşitler ile yapılması, geleneksel tarımda yerel çeşitlerin kullanımını azaltmasının yanında tohumluk ve ilaç bakımından dışa bağımlılık sorununu yaratacaktır. Transgenik tohumluğun her yıl yenide alınması zorunluluğu ve fiyatın yüksek olması küçük çiftçilerin ekonomik zararına neden olabilir. Genel olarak transgenik ürünlerin yerel tarım sistemlerinin zayıflaması ve dışa bağımlılığın artması, tarımsal biyoteknolojinin tarımsal ürün yetiştiricilerine ve tüketicilerine olası etkileri, tarımsal biyoteknolojinin neden olabileceği ekonomik kayıplar, tarım ve ormancılığın sürdürülebilirliğine etkisi gibi sosyo-ekomomik etkileri endişe oluşturmaktadır.

Sosyo-ekonomik etkilerin bir diğer boyutu ise transgenik ürünlerin tüketiciler tarafından tercihi ve halkın kabulü olup; tüketicinin ne yediğini bilmesi ve tercihini ona göre yapabilmesi için bu ürünlerin etiketlendirilmesinin zorunlu tutulmasıdır. Etiketleme, tüketici ve kullanıcıların ürün hakkında bilgilendirerek, bilgiye dayalı bir seçim yapmalarını sağlar. Böylelikle organik tarım yapan üreticilerin, halkın organik gıdaya ulaşımı konusundaki endişelerini de bitecektir (Holmes, 2008).

İzlenebilirlik, genetiği değiştirilmiş ürünlerden üretilmiş ya da içinde yabancı gene sahip olan ürünlerin tedarik zincirinin her aşamasında takip edilebilir olmaları anlamına gelmektedir. Bunun sonucunda, tüm genetiği değiştirilmiş gıda ve yemlerin çevreye ve insan sağlığına olan bütün etkilerinin yakından takibi ve beklenmeyen bir risk durumunda ürünlerin derhal üretimden ve dağıtımdan çekilmesi öngörülmektedir. İzlenebilirlik kuralı çiftçilerden, gıda ve yem üreticilerine kadar, süreç dahilindeki tüm işletmecileri kapsamaktadır.

2.9.PATATES

Patates, patlıcangiller (Solanacae) familyasının, *Solanum tuberosum* L. Cinsinden olup tek yıllık kültür bitkisidir. Orijini ve kültüre alındığı bölge Güney Amerika'nın And Dağlarıdır (Şekil 2.11). Patates bitkisi 200 civarında tür ve 4000'den fazla çeşit içermektedir. İspanyollar tarafından 16. yüzyılın ikinci yarısında ülkelerine getirilen patates, buradan İngiltere, İrlanda ve İskoçya`ya, daha sonra diğer Avrupa ülkelerine dağıldığı bilinmektedir. Sömürgeleştirme sırasında da Avrupa`dan diğer kıtalara yayılmıştır. 19. yüzyıl sonlarında Türkiye`de ilk kez görülen patates, önce Doğu Karadeniz Bölgesine, daha sonra da batıdan Trakya Bölgesine girmiştir (Berksan, 2002).

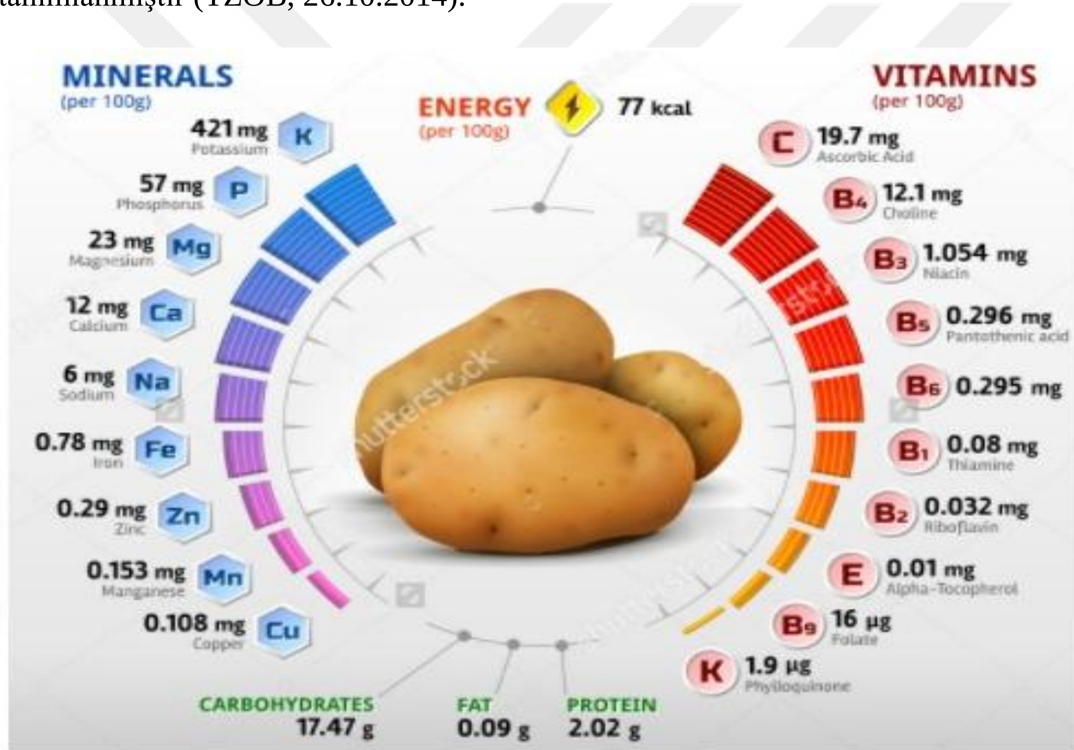


Şekil 2.11. Patates bitkisinin dünya ülkelerine dağılışı(https://sites.google.com/site/iemgec/final-project/maria-a)[Erişim Tarihi: 07.12.2017]

Günümüzde kullanılan patates, yabani bir çeşit olan *Solanum brevicaule* bitkisinden gelişmiştir (Spooner vd, 2005). Solanum cinsinde yer alan türler 12 kromozoma sahip olmakla birlikte, cins içerisinde diploid (2n=2x=24), triploid (2n=3x=36), tetraploid (2n=4x=48), pentaploid (2n=5x=60) ve hatta hekzaploid (2n=6x=72) olmak üzere çok farklı ploidi seviyelerine sahip olanlar bulunmaktadır (Huamán ve Spooner, 2002). Bu gün kabul edilen yaklaşık 196 tane yumru bağlayan yabani patates türü vardır (Spooner vd, 2005). Yabani patates türlerine *S. acaule*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. stoloniferum* ve *S. vernei* örnekleri verilebilir. Yabani patates türleri, çeşitli hastalıklara dayanıklılık konusunda önemli karakterler barındırmakta olup, yapılan ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Caligari, 1992;

HeřmanoVá vd, 2007). Bunlardan *Solanum demissum* ve *Solanum bulbocastanum* geç yanıklık hastalığına, *Solanum acaule* soğuk stresine (Hijmans, 2003), *Solanum acaule, Solanum demissum* ve *Solanum stenotomum* ise kuraklık stresine dayanıklılık gösterdiği bilinmektedir (Niederhauser, 1953).

Patates, temel gıda kaynakları arasında dünya nüfusunun beslenmesinde pirinç, buğday ve mısırdan sonra 4. sırada yer almaktadır (Onaran vd, 2000). Karbonhidrat, protein, vitamin ve mineral maddeler açısından zengin, beslenme değeri yüksek bir üründür (Şekil 2.12). Özellikle de azgelişmiş ve dengesiz beslenmenin yaygın olduğu ülkelerde önemli bir gıda kaynağıdır. FAO tarafından patates; taşıdığı ekonomik önem, besin değeri, dünyadaki açlığın ve kırsal yoksulluğun azaltılmasına sağladığı katkıdan dolayı "gizli hazine" olarak tanımlanmıştır (TZOB, 26.10.2014).



Şekil 2.12. Patates bitkisinin besinsel değerleri (USDA, 2017)

Dünyada üretilen patatesin yaklaşık olarak yarısı taze olarak tüketilmektedir. Geri kalanı ise işlenmiş gıda ürünü, endüstriyel nişasta,hayvan yemi ve tohumluk olarak kullanılmaktadır. Taze tüketim olarak daha çok fırında pişirme, haşlama, kızartma şeklinde olurken, işlenmiş gıdalarda ise dondurulmuş parmak patates ve cips şeklindedir. Patates nişastası; ilaç, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde yapışkan, tutkal yapımında kullanılmaktadır. Patates kabuğu ve işlendikten sonra kalan diğer atıklar ise nişasta yönünden zengin

olduklarından sıvılaştırılarak yakıt olarak kullanılan etanolün yapımı için mayalanabilmektedir (TZOB, 26.10.2014).

Dünya genelinde en önemli patates üreticisi olan ülkeler Çin, Hindistan, Rusya, Ukrayna ve ABD`dir. Bu beş ülkenin dünya patates üretiminden aldıkları pay % 50`yi aşmaktadır. Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi dünya genelinde Türkiye 3,9 milyon tonluk üretimi ile 19. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2015).

Çizelge 2.2. Dünyada önemli patates üreticisi ülkeler (2013)

Sıra No	Ülkeler	Ekim Alanı(ha)	Üretim (ton)	Payı (%)
1	Çin	5.772.000	88.925.000	24,2
2	Hindistan	1.992.200	45.343.600	12,3
3	Rusya	2.087.824	30.199.126	8,2
4	Ukrayna	1.391.625	22.258.600	6,0
5	ABD	425.730	19.843.919	5,4
6	Almanya	242.800	9.669.700	2,6
7	Bangladeş	443.934	8.603.000	2,3
8	Fransa	160.700	6.975.000	1,9
9	Hollanda	155.800	6.801.000	1,8
10	Polonya	337.200	6.334.200	1,7
11	Belarus	305.429	5.913.706	1,6
12	İngiltere	139.000	5.580.000	1,5
13	İran	190.000	5.560.000	1,5
14	Mısır	178.000	4.800.000	1,3
15	Kanada	142.100	4.620.000	1,3
16	Peru	317.132	4.570.673	1,2
17	Malawi	258.585	4.535.955	1,2
18	Cezayir	140.000	4.400.000	1,2
19	Türkiye	125.030	3.948.000	1,1
20	Pakistan	172.000	3.767.200	1,0
Dünya toplamı		**19.463.041**	**368.096.362**	**100,0**

Dünyada tüketilen başlıca tarım ürünlerinden olan patates içerdiği yüksek besin değeri yanında antioksidan içeriği sayesinde de oldukça zengin bir kaynak olup, insan sağlığını olumlu yönde etkisi olduğu düşünülmektedir (Brown, 2005, 2008; Cao vd, 1996). Antosiyaninler (Brown vd, 1993), fenolik bileşikler (Bulley vd, 2012) ve karatenoidler (Van Eck vd, 2007) patateste temel antioksidan aktivitesine sahip bileşiklerdir. Patates içerdiği çok farklı antioksidanlardan dolayı, süperoksit temizleme, demir iyonlarını bağlama ve kararsız bileşikleri indirgeme gibi farklı etkilere sahiptir (Singh ve Rajini, 2004). Farklı renklerde patates oluşumunda rol alan temel pigmentler, antosiyaninler (kırmızı, mavi, mor) ve

karatenoidlerdir (beyaz, sarı) (Van Eck vd, 2007). Bu pigmentler sahip oldukları yüksek antioksidan aktivitelerne sahiptir. Patates kabuk ve etli kısımların içerdiği renge göre tüketimi değişim arz etmektedir. Yaygın olarak tüketilen patates çeşitleri beyaz ve sarı renkli olsa da biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık, yüksek besin değeri, yüksek antioksidan içeriği, uzun depolama süresi gibi özel amaçlar için geliştirilen mor, kırmızı, pembe ve mavi renkli çeşitlerine de ilgi her geçen gün artmaktadır (Cao vd, 1996).

İnsan sağlığına faydalı olduğu düşünülen, antosiyanin içeriği yüksek olan patates çeşitleri kullanılarak çok sayıda antioksidan aktivitesi araştırmaları yapılmış ve halen yapılmaktadır. Mor ve kırmızı pigmentli patateslerle beslenen farelerin karaciğer ve serumunda antioksidan aktivitesi beslenmeyenlere göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Han vd, 2007). Kırmızı ve mor pigmentli patateslerin prostat, mide (Hayashi vd, 2006) ve meme (Thompson vd, 2009) kanserlerine karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan laboratuvar fare araştırmaları sonucunda rapor edilmiştir. Buna benzer şekilde, patates glikoalkoloidlerinin de insanlarda görülen kolon (HT29), karaciğer (HepG2) (Lee vd, 2004), rahim, mide (Friedman vd, 2005) ve lenfoma kanser hücrelerinin büyümesini engellediği gözlemlenmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda bazı renkli genotipli patateslerin zengin polifenol ve antosiyanin içerdiği rapor edilmiştir (Becalski vd, 2003; Brown vd, 1993; Hirsch vd, 2013). Bundan dolayı da pigmentli patateslere ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Türkiye genelinde ise; 2012 yılında patates üretimi 4,8 milyon ton civarında iken, 2013 yılında % 18`lik bir düşüşle, 3,9 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Belirli bir üretim planlaması olmadığı için fazla üretim yapılan 2012 yılında girdi fiyatlarındaki artışlara karşılık, patates piyasada hak ettiği değeri bulamamıştır. Buna ihracat imkânlarının kısıtlı oluşu da eklenince, satılamayan patates tarlada, depolarda kalmış, hayvan yemi olmuş, hatta çöpe gitmiştir. Bu nedenle çiftçi 2013 yılında patates ekimini azaltmış, bazı tüccarlar elindeki ürünü daha yüksek fiyatlara satmak için stok yapmıştır (Çizelge 2.3) (TÜİK, 2015a).

Çizelge 2.3. Türkiye`de yıllara göre patates ekiliş, üretim ve verimleri(TÜİK, 2015a)

Yıllar	Ekilen alan (Dekar)	Üretim (Ton)	Verim (Kg / Dekar)
1988	1.960.000	4.350.000	2.219
1989	1.875.000	4.060.000	2.165
1990	1.920.000	4.300.000	2.240
1991	2.004.000	4.600.000	2.295
1992	1.950.000	4.600.000	2.359
1993	1.920.000	4.650.000	2.422
1994	1.900.000	4.350.000	2.289
1995	2.000.000	4.750.000	2.375
1996	2.100.000	4.950.000	2.357
1997	2.110.000	5.100.000	2.417
1998	2.030.000	5.250.000	2.586
1999	2.200.000	6.000.000	2.727
2000	2.050.000	5.370.000	2.620
2001	2.000.000	5.000.000	2.500
2002	1.980.000	5.200.000	2.626
2003	1.950.000	5.300.000	2.718
2004	1.776.000	4.770.000	2.686
2005	1.528.000	4.060.000	2.657
2006	1.579.084	4.366.180	2.765
2007	1.525.975	4.227.726	2.771
2008	1.478.883	4.196.522	2.838
2009	1.428.738	4.397.711	3.078
2010	1.388.660	4.513.453	3.250
2011	1.429.849	4.613.071	3.226
2012	1.720.867	4.795.122	2.786
2013	1.250.297	3.948.000	3.158
*2014	1.540.000	4.160.000	2.700

* Tahmini

Türkiye`de hemen hemen her ilde patates üretimi yapılmaktadır. Üretim yoğun olarak sırasıyla Niğde, İzmir, Konya, Afyon ve Kayseri illerinde gerçekleştirilmekte; bu illeri sırasıyla Bolu, Adana, Nevşehir, Aksaray, Bitlis izlemektedir. Toplam patates üretiminin yaklaşık % 75`i bu illerde üretilmektedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. İllere göre sofralık patates ekim alanları ve üretimi(TÜİK, 2015a)

	Ekim alanı		Üretim		Verim
İller	Dekar	Payı (%)	Ton	Payı (%)	(Kg/dekar)
Niğde	153.510	12,3	512.644	13,0	3.339
İzmir	115.034	9,2	441.279	11,2	3.836
Konya	107.938	8,6	420.755	10,7	3.898
Afyon	83.891	6,7	306.377	7,8	3.654
Kayseri	75.197	6,0	299.346	7,6	3.981
Bolu	83.976	6,7	247.093	6,3	2.943
Adana	50.288	4,0	179.775	4,6	3.575
Nevşehir	40.660	3,3	177.620	4,5	4.368
Aksaray	54.239	4,3	173.756	4,4	3.204
Bitlis	37.770	3,0	165.407	4,2	4.379
10 il toplamı	802.503	64,1	2.924.052	74,3	3.644
TOPLAM	1.250.297	100,0	3.948.000	100,0	3.158

2.10.TRANSGENİKPATATES

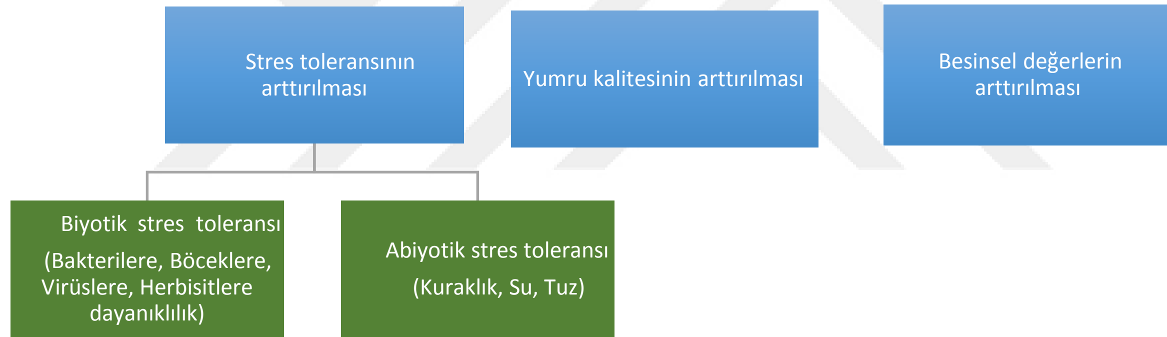
Patates, biyoteknoloji kullanarak özelliklerin tanıtılması için ideal bir bitkidir. Virüse dirençli tütünden (1992'de Çin) ve Flavr Savr domatesinden (1994'de ABD) sonra patates, genetik olarak modifiye edilmiş ilk ürünlerden biridir.1995 yılında ABD'de, Colorado Potato Beetle direnci sağlamak için *Cry3A* genini içeren Russet Burbank çeşidi olan New Leaf^{Tm} olarak adlandırılan tarımsal üretimde kullanılan ilk biyoteknoloji patatesi piyasaya sunulmuştur (USDA-APHIS, 2015).

Dünyada uygulanan geleneksel patates ıslahı, geçtiğimiz yüzyılda az değişen verimsiz, yavaş bir süreçtir. Patates, verimli ve kaliteli olması, hastalıklardan ve böceklerden korunmak için önemli besinleri, böcek ilacı ve su girişini gerektirmektedir. Patates yetiştirme çabalarında, geçmişte verim, taze pazar, işleme kalitesi ve depolanabilirliğe olduğu kadar hastalık direncine de odaklanılmıştır. Ticari varyetelerde bu özelliklerin genetik çeşitliliği düşüktür ancak ilişkili yabani türler, çeşitlerde bulunmayan birçok özelliği içermektedir ve özellikle hastalık direnci ve yumruluk kalitesi genlerinin zengin bir kaynağını temsil etmektedir (Jansky, 2000). Yabani türlerden yetiştirilen patateslerde, zararlılara ve abiyotik streslere karşı özelliklerini ve toleranslarını devam ettirebilmeleri için çaba gösterilmiştir. Ancak popüler çeşitlerin, genetik karmaşıklığı, geçmişlerde öngörülemeyen uyarlanmış ifadesi işleme kalitesinde değişkenliği sınırlamaktadır. Bu çeşitlerin endüstri tarafından talepleri nedeniyle yabani germplazmdan türetilen birkaç özelliği barındırmaktadır (Hirsch vd, 2013). Tüketicilerin ve işlemcilerin arzu ettiği kaliteli yumru kök özelliklerini tarımsal performans ve hastalık direnciyle birleştirmek, patates yetiştiriciliğinde en önemli çalışmasıdır. Neyse ki, yabani ve ekili patates akrabalarında muazzam genetik çeşitlilik miktarı, biyoteknolojiyi kullanarak belirli yeni genlerin kolay teşhis edilmesine, izolasyonuna ve yeni genlerin kullanılmasına olanak sağlamıştır.

Biyoteknolojiyi kullanarak patates içerisine yeni özelliklerin entegrasyonu, aynı amacı gerçekleştirmek için geleneksel ıslah yöntemine kıyasla bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Geleneksel yetiştirme yöntemleri, iki heterozigot tetraploid ebeveynin, geniş bir şekilde farklı fenotipik çeşitlerinin yeni nesile geçilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, küçük bir yüzde olarak her iki ebeveynin istenen özelliklerinden bazılarını da içermesi beklenmektedir. Bununla birlikte, bu süreç aynı zamanda daha sonra seçilmesi gereken istenmeyen özelliklerin dahil edilmesine izin verir ve bu nedenle, ilk çaprazdan sonra yeni pazarlanabilir bir patates çeşitliliği üretmek uzun bir süre (10-15 yıl) alabilmektedir. İstenen

özelliklerle ilişkili moleküler belirteçlerin kullanımı bu işlemi önemli ölçüde hızlandırabilmektedir. Geleneksel yetiştirmenin aksine, *Agrobacterium*'u kullanarak patates içine spesifik bir gen yerleştirerek bütün bir bitkinin yenilenmesi sadece 6-12 aydır. Buna ek olarak, dönüşüm için kullanılan hedeflenmiş germplaz, arzu edilen agronomik özelliklere ve hasat sonrası işleme özelliklerine sahip yumrular üreten mevcut bir çeşit olabilmektedir. Birden fazla genin aynı anda verilmesine izin verecek şekilde *Agrobacterium* transfer DNA eklerinin yaklaşık 150 kilo baz DNA'ya kararlı entegrasyonu bildirilmiştir (Hamilton vd, 1996). Özellik entegrasyonu için biyoteknolojinin kullanılmasının bir dezavantajı, ilgilenilen gen(ler) önce tanımlanmalı ve kopyalanmalıdır; bu da önemli uzmanlık ve çaba gerektirmektedir. Genler, homozigotluk elde etmek için tekrar çaprazlamaya gerekli olmadığından, özellikle ilgi çekicidir (Pandey vd, 2015).

Genel olarak patates bitkisinde yapılan çalışmalarla; bitkinin stres koşullarına dayanıklılığının, yumru kalitesinin ve besinsel değerlerinin arttırılması hedeflenmiştir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Transgenik patateslere kazandırılan özellikler (Halterman vd, 2016)'dan faydalanılarak yazar tarafından çizilmiştir

<u>Biyotik ve abiyotik Stres toleransı:</u> Zararlılara karşı direncinin ekili çeşitlere girmesi pestisit uygulamalarını azaltacaktır. Benzer şekilde, patates suyunun kullanım verimliliğini düzenleyen gen ekspresyonunun manipüle edilmesi su eksikliği koşullarında ürünün yetişme performansına izin verecektir. Neyse ki, yabani ve ekili patates germplaz koleksiyonları çeşitlidir ve birçok yabani tür ekonomik açıdan önemli hastalıklara karşı dirençlidir. Hastalıklara karşı direnç, entegrasyonu nispeten kolaydır çünkü çoğu özellik, baskın bir biçimde kalıtılan tek genlerdir. Patojen mevcut olduğunda tek genler konakçı üzerinde çarpıcı bir etkiye sahip olabilir, ancak bazı patojen genotiplerinin hızlı bir şekilde gelişmesi, kullanım

sonrasında hastalık direncinin bozulmasına neden olmuştur. Popüler çeşitlerde stres direncini hızlı bir şekilde arttırmak ve birden fazla geni direnç için birleştirmede biyoteknolojiyi kullanma kabiliyetimiz, geleneksel yöntemlerin üzerinde bazı avantajlar sunmaktadır.

Bitkilerde bulunan ve bir çeşit savunma işlevi gören PRR (kalıp tanıma resöptörleri)'ler, patojen ilişkili moleküler kalıpları (PAMPs; Zipfel, 2014 tarafından incelendi) tanırlar. Bu tanıma kalıp reseptör proteinleri PAMP'ların varlığını tanır ve savunma yanıtlarını aktive eder. Hedef bir bitkiye bu reseptörlerden aktarımının o bitkide direnç ürettiği belirlenmiştir. Örneğin, *Arabidopsislektin reseptör kinazı LecRK1.9*, patates ve tütüne eksprese edildiğinde *P. infestans'*a karşı artan direnç kazandırmaktadır (Bouwmeester vd, 2014).

Birçok PRR'nin patateste bulunması muhtemel olsa da şu ana kadar tespit edilen tek PRR, *P. infestans'*tan INF1 elisitinin varlığını tanıyan ELR proteindir (Du ve ark., 2015). Diğer PRR'ler, EIX2 (fungal ksilanazın tanınması) (Ron ve Avni, 2004), Ve1 (*Verticilliumdahliae*'nin Ave1 proteininin tanınması ve Cf-9'un (AVR9 peptidinin tanınması) dahil olduğu diğer domateslerde tanımlanmıştır *Cladosporium fulvum*; (Jones vd, 1994). PRR'lerin aileler arası transfer yapabildikleri göz önüne alındığında, *Solanaceae* ailesi içerisindeki PRR'lerin patates hastalık direncini artırabileceği muhtemeldir (Halterman vd, 2016).

Ekili patatesin yabani akrabalarından patates mantarı hastalığı patojeni *Phytophthora infestanlar*'a dirençli birkaç genin tanımlanması ve klonlanması son 15 yıl içinde gerçekleşmiştir. Örneğin, *Solanum demissum*'dan *Rı, R2 ve R3a* (Ballvora vd, 2002), *S.Bulbocastanum*'dan *Rpi – blb1, Rpi - blb2 ve Rpi - blb3* (Lokossou vd, 2009; Song vd, 2003; Van Der Vossen vd, 2003), *S. venturii*'den *Rpi – vnt1.1* (Foster vd, 2009; Pel vd, 2009) ve *S. Mochiquense*elde edilen *Rpi - mcq1* genlerinin (Jones vd, 1994) hepsi *P. infestans* suşuna karşı direnç sağlamaktadır. Bu ilave genler, geç yanmazlığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek tamamlayıcı genetik varyasyon sağlar. 2011'de BASF, Fortuna adlı biyoteknoloji, geç dirençsiz patatesin serbest bırakılması için başvuruda bulundu. Fortuna, iki direnç geni, *Rpi-blb1 (RB)* ve *Rpi-blb2* içerir. Ancak, Fortuna patates hiçbir zaman pazarlamayı yapmadı. Simplot'un Innate^{Tm} patatesinin ikinci jenerasyonu geç yanmazlık direncini içerecektir.

Yabani patates akrabalarından izole edilengeç yanıklılık *R* genlerine ek olarak, birkaç *R* geni klonlanmıştır. *S. tuberosum* ssp. *Andigena* ve *S.acaule*'den sırasıyla izole edilen *Rx1* ve *Rx2* genleri; patates virüsü X'e (Bendahmane vd, 2000), karşı direnç sağlamıştır.

S.spegazzinii'nin *Gro1-4* geni kök kist nematodu *Globodera rostochiensis*'e ve *S. tuberosum* ssp. *Andigena*'da bulunan *Gpa2* geniise soluk kist nematodu *G. pallida*'ya karşı direnç kazandırmaktadır (Paal vd, 2004). Şimdiye kadar sadece birkaç hastalık için patates *R* genleri tanımlanmış olsa da, bu araştırma yolu dünyanın birçok laboratuvarında bir öncelik olarak kalmaya devam etmektedir.

PRR ve R proteinlerine ek olarak, diğer genler ve mekanizmalar biyoteknoloji kullanarak patates hastalık direncini arttırma potansiyeline sahiptir. Buna bir örnek olarak, bir çok bitki türünde virüs direnciyle ilişkili olduğu bulunan *eIF4E* genidir (Kang vd, 2005; Kanyuka vd, 2005; Nicaise vd, 2003; Yoshii vd, 2004). Patates yabani tür akrabaları *S.chacoense, S. demissum* ve *S. etuberosum*'da bulunan *eIF4E* varyantlarıpatates virüsü Y (PVY) 'ye karşı direnç kazandırarak gelecekteki biyoteknolojik patates çeşitlerinde bu genin nihai olarak kullanılmasına izin verilecektir (Duan vd, 2012). PRR veya R proteinlerinden farklı olarak, eIF4E proteini direnci ortaya çıkarmak için spesifik bir patojen molekülünün varlığını tanımaz. Bunun yerine, viral genomik RNA'nın düzgün bir şekilde çevrilmesi için gereken bir konak proteinidir. *EIF4E* içerisindeki mutasyonlar, proteini virüs tarafından kullanılamaz hale getirir ve bu nedenle virüs, bitki hücresi içinde çoğalamaz (Ruffel vd, 2002).

Konakçıya bağlı gen susturma (Host induced gene silencing; HIGS), gerekli patojen genlerin ekspresyonunu hedeflemek için RNA girişimine dayanan bitki patojenlerini kontrol etmek için nispeten yeni bir yaklaşımdır. Bu strateji, böcekler dahil olmak üzere geniş patojen türleri hedeflemek için kullanılmıştır (Baum vd, 2007; Huang vd, 2006; Sindhu vd, 2008; Yadav vd, 2006). Normal patojen büyümesi için gerekli virülans veya "temizlik" genleri için gerekli patojen efektörler tipik olarak HIGS için hedeflerdir. Küçük engelleyici RNA'ların (siRNA'ların) üretimiyle sonuçlanan gen fragmanlarının ifadesi konukçu bitkide ekspres edilir. SiRNA'lar daha sonra hedef genleri susturmak için enfeksiyon esnasında patojene geçer. Patateste kullanan tek HIGS sonucunda, patojenite açısından önemli olan bir proteini kodlayan *P. infestans* geni *hp-PiGPB1*'in hedeflenmesi, transgenik bitkilerde sporangia oluşumunun ve hastalık ilerlemesinin azalmasına neden olmuştur (Jahan vd, 2015). HIGS, patojen virüslerindekispesifik genlerin önemini belirlemek için sadece deneysel bir araç sağlamıyor aynı zamanda, konukçudan *R* genlerini belirleyip klonlamaya gerek kalmadan bitki hastalıklarını kontrol altına almanın yeni bir yolunu sunmaktadır.

Çoğu modern patates çeşidi, kuraklığa duyarlı olarak kabul edilir (Cabello vd, 2012; MacKerron ve Jefferies, 1988; Monneveux vd, 2013; Weisz vd, 1994; Yuan vd, 2003).

Arabidopsis thaliana'da, cap-binding protein 20'nin (CBP20) fonksiyon kaybıyla absisik asit sinyal transdüksiyonunun manipüle edilmesi, kuraklığa toleransın artmasına neden olur (Papp vd, 2004). CBP20, çekirdeğe translokasyona tabi tutulan bir aktif kompleks oluşturmak üzere cap-binding protein 80 (CBP80) ile etkileşime girer (Kierzkowski vd, 2009). Patates çeşidi olan Desiree'de CBP80'in susturulması, kuraklığa karşı daha yüksek bir toleransa yol açmaktadır (Pieczynski vd, 2013).

Çizelge 2.5. Patateste zararlılara ve stres koşullarına karşı yapılan çalışmalar(Halterman vd, 2016)'dan faydalanarak yazar tarafından oluşturulmuştur

(PVX: Patates X virüsü, PVY: Patates Y virüsü, PLVVR: Patates yaprak kıvırcıklığı virüsü)

No	**Aktarılan gen**	**Kaynak**	**Kazandırılmak istenen özellik**	**Referans**
	PVXCP *PVYCP* *PLRVCP*	PVX, PVY, PLVVR	Virüs direnci	Marianne ve ark., 1992
	Pac 1	E.coli	Virüs direnci	Teruro ve ark., 1997
	R1, R2, R3a	Patates	Fungus direnci	Bulbocastorum ve ark., 2002 Huang ve ark., 2005 Lokossou ve ark., 2009
	Rpi-blb1 *Rpi-blb2* *Rpi-blb3*	Patates	Fungus direnci	Song ve ark. 2003 Vossen ve ark. 2003, 2005 Lokossou ve ark., 2009
	Gro1-4 *Gpa2*	Patates	Nematot direnci	Paal ve ark., 2004
	CBP20	A.thaliana	Kuraklık tolerans	Papp ve ark., 2004
	Cry IIIA	B.thurigensis	Böcek direnci	Kamenova ve ark., 2008
	Cry III *Cry 1B*	B.thurigensis	Böcek direnci	(Jung vd, 2004)
	Rpi-vnt1.1	Patates	Fungus direnç	Voster ve ark., 2009 Pel ve ark., 2009
	Rpi-mcq1	Patates	Fungus direnç	Jones ve ark., 2009
	Cry 1A	B.thurigensis	Böcek direnci	(Hur vd, 2004)

Yumru kalitesi özellikleri: Yüksek sıcaklıklar altında işlenmiş nişasta bakımından zengin gıdalardan üretilen akrilamid, yüksek dozlarda laboratuar hayvanlarında kansere neden olabileceği için bir endişe kaynağıdır ve "insan kanserojeni etkeni olması da beklenir" (National Toxicology Program 2011). Patates cipsi ve patates kızartması, akrilamid seviyelerine önemli katkı sağlar (Becalski vd, 2003). Akrilamit, yüksek sıcaklıkta indirgeyici şekerler (glikoz ve fruktoz)'in bir amino asit olan asparaginle kimyasal reaksiyonu sonucu oluşur. Bir biyoteknoloji stratejisi olarak, indirgeyici şekerlerin birikimini baskı altına almak için, asit invertaz enziminin (früktozve glikoz sıvı şekeri) üretiminin down regülasyonuna yoğunlaşıldı. Bu strateji, standart cipslik çeşitlerini soğuk tatlandırmaya karşı yüksek dirençli klonlara dönüştürmede çok başarılı olmuştur (Bhaskar vd, 2010; Ye vd, 2010). Akrilamid seviyelerini azaltmada diğer bir strateji, işlenmiş patates ürünlerinde asparagin sentezi için gerekli olan iki genin ekspresyonunu azaltmaktır (Chawla vd, 2012). Potansiyel akrilamid sorunlarını çözmek için Simplot takımından İnnate^{Tm} patates, düşük indirgeyici şeker düzeyli ve azaltılmış asparagin çeşitlerini birleştirmiştir (Anonymous, 2013).

Hasat ve saklama esnasında darbe nedeniyle yumruda kara leke ve kesildikten sonra kahverengileşen dokunun oluşumu, polifenol oksidaz enzimi (PPO) ile fenolik bileşiklerin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Stevens ve Davelaar, 1997). Patateste PPO genlerinin susturması, yaralanma ve ezilme nedeniyle yumru dokusuda oluşan enzimatik esmerleşmede bir azalmaya yol açar, Innate^{Tm} patates PPO'ın down regülasyonuyla kara leke hastalık direnci içerir (Bachem vd, 1994; Coetzer vd, 2001).

Çeşitli yumru kalite kusurlarına, indirgeyici şekerlerden glukoz ve fruktozun birikmesi neden olur. Şeker uçlu kusur ve kök uçlu çips kusurları nedeni, 10 °C'den daha az sıcaklıklarda depolanmalarda soğuktan kaynaklı tatlandırıcı içermesidir. Kızartma esnasındaki gibi indirgeyici şekerler, enzimatik olmayan bir amino asit ile reaksiyona (Maillar koyu renkli pigment üretim reaksiyonu) girer (Benzing-Purdie vd, 1985). İndirgen şeker içeriği yükselmiş yumrulardan yapılan çips ve kızartmalar kabul edilemez derecede koyu renge ve istenmeyen acı bir tada sahip olabilirler. Patates *vakuolar asit invertaz* geni *VInv*'nin susturulması düşük sıcaklıklarda depolanmış olan yumru köklerin indirgeyici şeker birikimini önler (Bhaskar vd, 2010). Benzer şekilde, *Vakuol invertaz* inhibitörü *INH2*'nin aşırı ekspresyonuyla invertaz asit aktivitesi ve depolanmış yumrularda indirgen şekerlerin birikimi azaltıldı (Mckenzie vd, 2013).

Geleneksel patates nişastası % 80 amilopektin ve % 20 amilozdan oluşmaktadır. Daha yaygın amilopektin endüstrisi(yapıştırıcı, tekstil, kağıt, inşaat malzemeleri vs.) tarafından

ihtiyaç duyulan özellikleri içerir olsa da, patates nişastasındaki amilozun mevcudiyeti pek çok teknik uygulamalarda sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle, patates nişastasının endüstriyel uygulamalara uygunluğu için önce amilozun ön işlemi gerektirir. 1981 yılından beri Amflora patatesi amiloz sentezini kontrol geni (*GBSS*) susturulmuş, AB tarafından onaylanan, ilk genetiği değiştirilmiş sadece amilopektin içeren üründür (Visser vd, 1991).

Çizelge 2.6. Patates yumru kalitesinin artışı yönünde yapılan çalışmalar(Halterman vd, 2016)'dan faydalanarak yazar tarafındanoluşturulmuştur

S. no	**Susturulan gen**	**Kaynak**	**Kazandırılmak istenen özellik**	**Referans**
1	*GBSS*	Patates	Nişastada Amilopektin oranın arttırılması.	Visser ve ark.,1991
2	*PPO*	Patates	İndirgen şeker birikiminin önlenmesi (kararmanın engellenmesi)	Bachem ve ark., 1994 Coetzer ve ark., 2001 Ki ve ark., 2014
3	*VInv*	Patates	Yumrulardaki indirgeyici şeker birikimini önlenmesi.	Bhaskar ve ark.,2010
S. no	**Aktarılan gen**	**Kazandırılmak istenen özellik**		**Referans**
1	*STS (gümüş thiosulfate)*	Taze ağırlık artışı		Chang ve Chan, 1991
2	*AGPase*	Yumruda nişasta artışı		Stark ve ark., 1992
3	*Ipt (izofenil transferaz)*	Yumru oluşumu artışı		Lafta ve ark., 2005
S. no	**Aşırı eksprese edilen gen**	**Kaynak**	**Kazandırılmak istenen özellik**	**Referans**
1	*INH2*	Patates	İndirgen şeker birikiminin önlenmesi (kararmanın engellenmesi)	McKenzie ve ark., 2013

Besinsel değerler: Skorbat veya C vitamini alımı, öncelikle sebze ve meyve tüketilmesi yoluyla elde edilir. Patates yumruları askorbat içerse de, nispeten zayıf bir kaynaktır. Fırınlanmış patatesin bir buçuk su bardağı (61 gr), günlük tavsiye edilen 40-90 mg'ın sadece 8 mg'ını karşılar (USDA-APHIS, 2015). Ancak, patates artan düzeylerde askorbat üretme kapasitesine sahiptir. *GDP-L-galaktoz fosforilaz* patates geninin aşırı ekspresyonu yoluyla askorbat oranının üç kat artışı sağlanabildiği bildirilmiştir (Bulley vd, 2012).

Beta-karoten, insanlarda A vitamini sentezi için primer substrattır. Birçok patates beta karotence fakirdir. Bazı hatlarda yüksek seviyede ksantafillerden biri olan zeaksantin üretilir. Beta karoten hidrolaz enzimi aktivitesi ile beta karotenden ksantofil elde edilmiştir (BCH; (Brown vd, 1993). RNAi, kullanarak patatesteki *BCH* genini susturarak yumrularda, zeaksantinin düşük olduğu hatlarda bile, önemli ölçüde beta karoten içeriğini arttırmıştır (Van Eck vd, 2007). Bu hatlarda beta karoten seviyesi karotence zengin havuç ve tatlı patates seviyelerine ulaşmıştır. Patatesten biyoyararlanma, küresel olarak popüler olan bir besin kaynağına, ek beslenme avantajları sağlamak için bir fırsat sunmaktadır (Halterman vd, 2016).

Patateste üretilmiş glikoalkaloidler (esas olarak α-Solanine ve α-chaconine) lezzete olumlu katkıda bulunsa da, yüksek düzeyde acı ve toksisiteye neden olmaktadır. Yaralanma ve ışığa maruz kalma glikoalkaloid içeriğini etkilediği bilinmektedir. Bu, 100 gramlık taze ağırlık başına 20 mg'lık eşiğin üzerindeki seviyelere yol açabilir (Petersson vd, 2013). Patatesin bir çok yabani türü doğal olarak yüksek seviyelerde glikoalkaloid üretmektedir (Gregory vd, 1981). Bu nedenle yetiştiriciler, germplaz geliştirmek için yabani tür kullanırken, glikoalkaloid seviyelerine dikkat etmelidirler. Bir sterol alkaloit glikosiltransferaz kodlayan genin susturulması α-solaninin hemen hemen hepsinin ortadan kaldırılmasına yol açmıştır (McCue vd, 2005).

Çizelge 2.7. Patates yumru besin değerinin artışı yönünde yapılan çalışmalar (Halterman vd, 2016)'dan faydalanarak yazar tarafındanoluşturulmuştur

S. no	**Susturulan gen**	**Kaynak**	**Kazandırılmak istenen özellik**	**Referans**
1	*Sterol alkaloit glisiltransferaz kodlayan gen*	Patates	Glikoalkaloid oranının düşürülmesi	McCue ve ark. 2005
2	*BHC (beta karoten hidrolaz)*	Patates	Beta karoten artışı (A vit.)	Van ve ark., 2007
S. no	**Aşırı eksprese edilen gen**	**Kaynak**	**Kazandırılmak istenen özellik**	**Referans**
1	*GDP-L-galaktozfosforilaz*	Patates	Cvitamini oranında artış.	Hemavathi ark., 2010 Bulley ve ark., 2012)

Genel olarak bakıldığında, patateste biyoteknoloji kullanarak geç yanıklık direncinin arttırılması, düşük akrilamit potansiyelinin kazandırılması, siyah leke hastalığının ve indirgenmiş şeker birikiminin önlenmesi ekonomik ve çevresel yararlardan bazılarıdır

(Halterman vd, 2016). Bu özelliklerin yanı sıra diğer faydaları ise, patates atığının azaltılması, daha iyi taze paketleme ve artan yetiştirme karıdır.

2.11. BİYOGÜVENLİK

Teknolojik gelişmeler, tarımsal üretim ve verimde artışı sağlarken, ürünlerden kaynaklanan riskleri de beraberinde getirmektedir. Bilimsel ve teknolojik yenilikler, tarımsal üretimde artış sağlarken önemli tartışmalara da yol açmıştır. Genetik yapısı değiştirilen canlıların ve bunların meydana getirdikleri metabolik ürünlerin kısa ve uzun vadede ekoloji üzerinde nasıl bir etki yapacağı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu belirsizlik; ‘‘biyoteknolojide güvenlik’’ önlemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir (Anonim, 2010).

Biyogüvenlik, “modern biyoteknoloji teknikleri uygulamalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin insan sağlığı ve biyolojik çeşitlilik üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesi sürecini ve belirlenen olumsuzlukların meydana gelme olasılığının ortadan kaldırılması ya da meydana gelme durumunda oluşacak zararların kontrol altına alınması için gerekli tedbirleri” ifade etmektedir. Modern biyoteknoloji uygulamalarında kullanılan yöntem, canlıda meydana gelendeğişiklik ve canlının oluşturduğu ürünün kullanım amacı ile yeni farklı riskler oluşturduğundan, ayrı tedbirler gerektirmektedir. Bu nedenle biyogüvenlik, laboratuvar ve kapalı ortam denemeleri (sera çalışmaları dahil), doğaya salımı ve gıda olarak kullanımı durumları için, ayrı düzenlemeleri gerektirmektedir (Anonim, 2000).

BM Endüstriyel Kalkınma Organizasyonu (UNIDO) Sekretaryası’nın yayınladığı “Organizmaların Çevreye Salınımı Konusunda Gönüllü Talimatı” (1991), FAO (BM Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından yayınlanan "Bitki Biyoteknolojisi Talimatı” (1991), “Gündem 21” (1992), Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) tarafından hazırlanmış olan, gelişmekte olan ülkelerin biyogüvenlik kapasitelerini oluşturmalarında kılavuzluk yapılması amacıyla “Biyogüvenlik Kılavuzu” (1997), BM Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (1992) ve son olarakhala geçerliliği devam eden BM Cartagena Biyogüvenlik Protokolü (2003) başlıca uluslararası biyogüvenlik düzenlemeleridir (Korkut ve Soysal, 2013).

Fransa’da, Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması gereğince hazırlanan Protokol, 130’dan fazla ülke tarafından 29 Ocak 2000 tarihinde kabul edilmiştir. 11 Eylül 2003 tarihinde yürürlüğe giren bu protokolün amacı insan sağlığı üzerindeki meydana gelebilecek riskler göz önünde bulundurularak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve

sürdürülebilir kullanımı üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilecek ve modern biyoteknoloji kullanılarak değiştirilen canlı organizmaların güvenli nakli, muamelesi ve kullanımı alanında yeterli bir koruma düzeyinin sağlanmasına katkıda bulunmaktır. 2002 yılında GDO'ların risk değerlendirmelerini yapmak üzere Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurulmuştur. EFSA, GDO'ların insan sağlığı ve çevre üzerindeki oluşabilecekolumsuz etkilerini bilimsel esaslar çerçevesinde değerlendirmekte ve nihai kararı ise Avrupa Birliği Komisyonu vermektedir (Çetiner, 2010).

Avrupa Birliği Mevzuatı GDO'lar için hazırlanmış en yetkili mevzuattır. Genetiği değiştirilmiş yem ve gıdaların pazara sunulması ile ilgili izinlerden etiketleme ve izlenebilirliğine kadar tüm aşamaları kapsayacak şekilde hazırlanmış bir tüzüktür. Avrupa Birliğinin, WHO, EFSA, FAOgibi örgütlerin katkılarıyla GDO'lara ilişkin yasal düzenlemesi, genetiği değiştirilmiş gıda ve yemlerin kullanımı ile ilgili genel bir çerçeve ortaya koymaktadır. AB tarafından çizilmiş bu çerçeve ile iç tüketimi aksatmaya uğratmadan etkin bir tarzda çalıştırmayı sağlarken, aynı zamandainsan sağlığını, çevreyi ve tüketici haklarını küresel hedeflere ulaştıracak tarzda en iyi şekilde korumayı amaçlayan çalışmadır. AB'de genetiği değiştirilmiş organizmaların denetiminin her aşaması izlenebilirlik ve etiketleme yoluyla yapılmaktadır. AB içerisinde pazarı bulunan bütün gıda ve yemlerin genetiği değiştirilmiş gen bulundurup bulundurmadıklarına dair bir etiket taşımak zorundadır. Etiketlemede % 0,9 aşılması istenmeyen oran olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu oran, ürün yabancı gen içermese de ekim vaktinde olabilecek herhangi bir çapraz tozlaşma, hasat saklama ve taşıma koşulları gibi nedenlerle ürüne yabancı genin bulaşabileceği ihtimali göz önünde bulundurularak kabul edilmiştir. Etiketlemenin zorunlu hale gelmesi ile Avrupa Birliği kapsamında bulunan tüketicilere genetiği değiştirilmiş ürünün üretim ve tüketim tercihi sunularak, tercihli tüketim hakkı da tanınmış olmaktadır (Korkut ve Soysal, 2013; Meriç, 2012; Öztürk, 2011).

Kanada da; GDO'ların ihracatında önemli bir yere sahip olan, yeni teknolojilerin kullanımı ile elde edilen her çeşit bitkilerde, geleneksel üretim yöntemi, mutasyon ya da rekombinant DNA teknolojisi olup olmadığına bakılmaksızın etiketlenmektedir. Genetik değişiklik yapılmış ürünler 'yeni gıda' olarak değerlendirilmektedir. Kanada Biyoteknoloji Tavsiye Komitesi genetiği değiştirilmiş gıdalarla ilgili mevzuat yönetmeliği yenilemiştir. Komite, GDO'ların uzun süreli sağlık etkilerini izlemeye yönelik araştırmaların yapılmasına yönelik tavsiye görüşlerde de bulunmaktadır. Kanada da, ABD'deki gibi etiketleme zorunluğu bulunmamaktadır (Federica ve Francesca, 2005).

Çin'de ise, 2002 yılından önce tarımsal biyogüvenlik prensipleri ürün temelli bir yaklaşımın çerçevesini belirlemekteydi. Fakat 2002 Mart ayından itibaren Çin'de etiketlemenin zorunlu tutulduğu bir anlayış hakimdir. GDO'lara getirilen zorunlu etiketleme yöntemi, Çin'in ürün temelli biyogüvenlik yönetimini, biraz olsun değiştirerek, süreç temelli bir sisteme dönüştürmüştür. Bu uygulama ile hem Çin'de hem de diğer dünya ülkeleri arasında tartışmalara neden olmuştur. Çin'de domates tohumu, ketçap, soya sütü, soya yağı, mısır yağı, kolza tohumu ve pamuk tohumu gibi 5 farklı bitkiden üretilen, 17 farklı ürün etiketlenmektedir (Yang vd, 2005).

Ülkemizde genetiği değiştirilmiş organizmalarla ilgili ilk yasal düzenleme 1998 yılında düzenlenen "Transgenik Kültür Bitkilerinin Alan Denemeleri" başlığı altındaki yönergedir. Uluslararası anlamda yapılan ilk çalışma ise, 2004 yılında TBMM tarafından onaylanan Cartagena Güvenlik Protokolü'dür. 2004 yılı Haziran ayında kanun hükmünde kararnamede yer verilen her türlü gıdanın üretimi, tüketimi ve kontrolüne yönelik hazırlanan madde değiştirilerek genetiği modifiye gıdalar adı altında genetiği değiştirilmiş ürünler ile ilgili kanun yasalaşmıştır. "Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik" 26 Ekim 2009 tarih ve 27388 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanmıştır. 28 Nisan 2010 tarihinde ise yönetmelikte değişiklik yapılmıştır. Transgenik ürünlerle ilgili risk değerlendirmesi yapan kuruluşların (EFSA, WHO, FAO) ve bilimsel araştırmaların sonuçları (allerjenik ve toksijenik etki analizleri, genetik modifikasyonun stabilitesi, morfolojik ve agronomik özellikler, hedef dışı organizmalara etkisi vb.) ile farklı ülkelerde üretim ve tüketim durumlarını da göz önünde bulundurularak belirli transgenik ürünlerle ilgili alınan Bilimsel Komite Kararları Bakanlıkça onaylanmıştır. Söz konusu Komite Kararına göre herhangi bir gıda ve yem ürününün GDO'lu olarak değerlendirilmesi ve etiketlendirilmesi için GDO oranının % 0.9 eşik değerinden fazla olması gerekmektedir. Tanımlanmamış ve risk değerlendirmeleri yetkili kurullar tarafından yapılmamış transgenik ürünler için bu eşik değer % 0 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Biyogüvenlik Kanunu" nun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, genetiği değiştirilmiş organizma ve ürünlerinin kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amacı ve alanı dışındaki kullanımı ve bu ürünlerin bebek mamaları ve bebek formüllerinde, devam mamaları ve devam formüllerinde, bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır (Korkut ve Soysal, 2013).

GDO'ların çevreye bilinçli salımı ve pazara sürülmesi ile ilgili başlatılan hukukî düzenlemeler, başlangıçta bir yönetmelik çerçevesinde hazırlanmış olsa da daha sonra düzenleme Ulusal Biyogüvenlik Kanun Taslağı'na dönüştürülmüştür. Cartagena Protokolü'nün hükümlerini içeren bir taslak olarak düzenlenmiştir. Taslak, genel çerçevesi itibariyle, GDO'ların bilinçli salımı ve pazara sürülmesi konularını, canlı sağlığı ve çevre açısından meydana getirebileceği riskleri göz önünde bulundurarak, idarî kuralları, kurumsal işleyişi ve izlenmesi gereken kontrol işlemlerini içermektedir (Mutlu, 2016).

2.12.GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TANISI

Genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinden elde edilen ham materyal ve işlenmiş ürünler, aktarılan genin DNA dizisinin veya bu gen tarafından şifrelenen yeni proteinlerin saptanması ile tanımlanmasına dayalı ve kalitatif (var/yok analizleri) ile kantitatif (miktar analizleri) analizler olmak üzere başlıca iki yaklaşım söz konusudur.Çizelge 2.8'de GDO tayininde kullanılan yöntemler genel hatlarıyla gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. GDO analiz etme yöntemleri

ANALİZ	TEST	YÖNTEM	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
İmmünolojik	Şerit testi	Protein	Hızlı, sahada yapılabilen, tohum ve tahıllarda kullanışlı.	Genellikle duyarlılığı düşük(% 0.1-1).
				İşlenmiş ürünlerde kullanımı uygun değil.
				Test laboratuvarında kontrolleri gerçekleştirilmediği için hatalı test sonuçlarına neden olan operatör hatası aynı anda ortaya çıkabilir.
				GM protein seviyeleri, farklı GM ticari çeşitleri ve bazı GM bitkilerinin farklı kısımları arasında değişebilir.
	ELİSA	Protein	Yüksek duyarlılıklı (% 0.01-%0.1).	Laboratuvar ortamında yapılabilir.
				İşlenmiş ürünlerde kullanımı uygun değil. GM protein seviyeleri, farklı
				ticari çeşitleri arasında değişebilir.
Genetik	PCR	DNA	Yüksek duyarlılıklı (% 0.01) ve spesifik. Tüm GDO'ları tespit edebilir. Kesin kantifikasyona izin verir.	Laboratuvar ortamında yapılabilir.
			Geniş örnek türlerinde kullanılabilir.	
			Gözlem ve test laboratuvarlarında dünya çapında kullanılan sanayi standardında.	

Proteine temelli yaklaşımda, araştırılan proteine karşı geliştirilmiş özel antikorlar kullanılır. Protein temelli immünokimyasal testlerden en yaygın kullanım alanına sahip olan ELISA yönteminde özel bir proteine bağlanması için bir antikor ve ilgilenilen protein standardı ile karşılaştırılarak, reaksiyonun sonucunu bir renk ürünü olarak ölçülebilen, antikora bağlı bir enzim kullanılır. Alternatif protein temelli yöntemler Lateral Flow Strips (LFS)'ler, immunomagnetik elektrokimyasal sensörler, 2-boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrofotometresi kullanımını içermektedir. Proteine dayalı yöntemler, ölçülebilir miktarda protein üretildiğinde pratik ve etkili bir analiz yöntemidir. Ancak genetik olarak değiştirilmiş ürünler yanlızca bazı gelişim safhalarında veya bitkilerin belirli bölümlerinde üretilirler ve bunları kolayca ölçmek mümkün olmayabilir. Ayrıca proteine dayalı yöntemler ile aynı protein özelliğini gösteren farklı transgenik vakalar arasındaki fark ayırt edilemeyebilir. Buna ilave olarak, özellikle endüstriyel işlemler proteinlerin kolayca bozulmasına neden olarak işlenmiş ürünlerde bu tekniklerin kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Elenis vd, 2008).

2.12.1. DNA İzolasyonu

Geniş kullanım alanı özgünlüğü yüksek verimi ve hızı dolayısıyla protein temelli yöntemlere göre daha yaygın olarak kullanılan DNA temelli yöntemler genellikle; DNA izolasyonu, çeşitli PCR yöntemlerine dayalı tarama, tanımlama ve miktar tayini aşamalarından oluşur.

Bütün rekombinant DNA tekniklerinin ilk aşaması, moleküler biyoloji çalışmalarda kullanılan DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması işlemleridir. Nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı bir sonraki aşamada PCR analizleri yapılacağı için önem arz etmektedir. Yüksek saflıkta inhibisyona yol açan maddelerden arındırılmış nükleik asitleri elde etmek için uygun ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır. Örnekteki PCR inhibitörlerinden kaynaklanabilecek negatif bir sonucun ortaya çıkmaması için PCR inhibisyonu kontrollü bir şekilde test edilmelidir (Terry vd, 2002). PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları

PCR inhibitörü Miktar	
SDS	> %0.005
Fenol	> %0.2
Etanol	> %1
İzopropanol	> %1
Sodyum asetat	> %5 Mm
Sodyum klorür	> %25mM
EDTA	> 0.5
Hemoglobin	> 1mg/ml
Heparin	> 0.15 i.u./ml
Üre	> 20 mM

Biyolojik materyalden DNA ekstraksiyonu; hücrelerin parçalanması, nükleazların inaktivasyonu ve DNA dışındaki nükleik asitlerin elimine edilmesiyle DNA'nın parçalanmış hücreden ayrımını gerektirir. Hücreleri parçalama işlemi mekanik parçalama (öğütme gibi) kimyasal uygulama (deterjanlarla parçalama gibi) ve enzimatik parçalama yöntemlerinden bir veya birkaçı kullanılarak gerçekleştirilir. Hücre ekstrelerinden nükleik asitlerin saflaştırılmasında kullanılabilecek teknikler ekstraksiyon (klorofom fenol), çöktürme (izopropanol etanol) santrifügasyon afinite klon kromotografisi olarak sıralanabilir (Somma ve Querci, 2010a).

İlk kez 1980 yılında Murray ve Thopmson tarafından geliştirilen CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) yöntemi modifiye edilerek bitki ve bitki kaynaklı gıda ve yem maddelerinden DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için kullanılabilen etkin bir yöntem haline getirilmiştir. Yöntem, özellikle Polisakkarit ve Polifelonik bileşenlerin elimine edilmesinde ve böylelikle saf DNA eldesinde etkilidir. Yapılan birkaç dikkatli değişiklikle birçok ham ve işlenmiş gıda ve yem matriksinde kullanılabilmesi için geliştirilmiştir (Somma ve Querci, 2010b).

Düşük tuz konsantrasyonunda nükleik asitlerle çözünmez bir kompleks oluşturan iyonik deterjan "setiltirimetilamonyum bromür" (CTAB) ile bitki hücreleri parçalanabilirler. Bu koşullar altında polisakkaritler, fenolik bileşenler ve diğer kontaminantlar üst fazda kalarak

uzaklaştırılmış olurlar. DNA kompleksi tuz konsantrasyonunu artırılması ile çözülür. Daha sonra DNA, etanol veya izopropanol ile çöktürülür. Bu üç temel aşamanın kuralı, hücre membranının parçalanması, genomik DNA'nın ekstraksiyonu ve çöktürülmesi olarak tanımlanabilir. Avrupa Birliği Referans Labaratuvarı (EURL- GMFF) soya ve mısır gibi pek çok tür için CTAB metodunun uygulanabilirliğini onaylamıştır (Delobel vd, 2012). DNA izalasyonu sonrası adımlar incelenen örneklerin yabancı gen içerip içermediklerini; eğer içeriyorlarsa bu yabancı genin hangi çeşit GDO'ya ait olduğunu ve miktarının kesin olarak belirlenmesini sağlayan yöntemlerden oluşmaktadır.

2.12.2.DNA Temelli Analiz Yöntemleri

DNA temelli analiz yöntemlerinde GDO analiz prosedürleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'a dayalı tarama, tanımlama ve miktar tayini olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır.

Tarama: Tarımsal ürün ve gıda DNA'sının bileşeni hakkındaki ilk bilgiye ulaşabilmek için gerçekleştirilir. Taramada hedeflenen amaç örneğin yabancı gen içerip içermediğini belirlenmesidir. Bu amaç için pozitif ya da negatif olarak sonuçlanan tarama metodu kullanılabilir (Anklam vd, 2002). Tarama genellikle PCR'a dayalı bir metottur. GD bitkilerin çoğunluğu Karnabahar Mozaik Virüsü (CaMV)'ne ait 35S promotorü ya da *Agrobacterium tumafaciens* napolitan sentetaz (NOS) terminatörü içeren dizilerle transforme edilmişlerdir. Genellikle tercih edilen klonlama vektörleri ise kanamisin antibiyotiğine karşı direnç geni (KanR) içeren plazmidlerdir. Sonuç olarak PCR metodları GDO taramasıyla geniş uygulamalara sahip T-NOS, P-35S, T-35S, npt2 dizilerini hedef alır (Holst-Jensen vd, 2003).

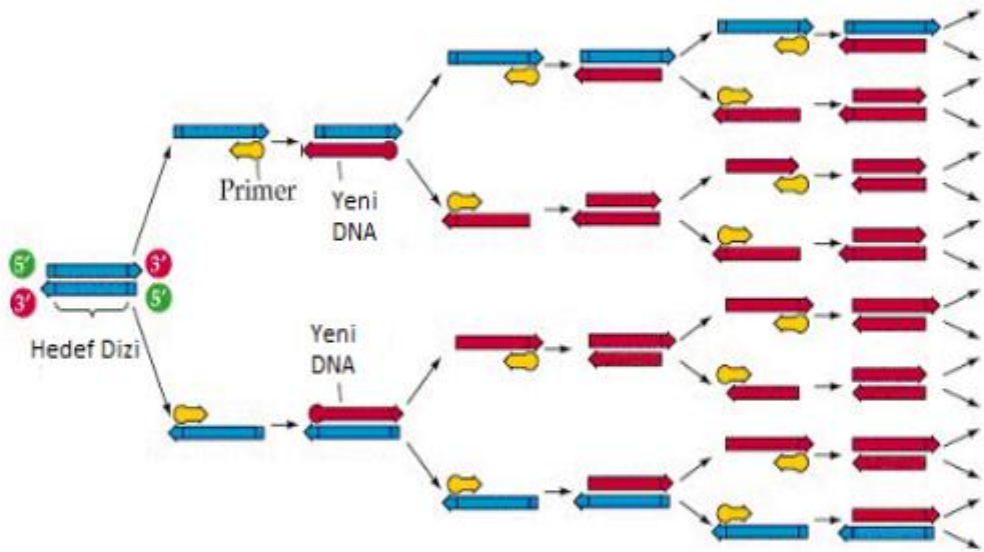
Tanımlama: Tarama sonuçları pozitif çıkması halinde hangi çeşit GDO olduğunu anlamak ve yetkililerce onaylanıp onaylanmadığının belirlenmesi için daha ileri analizlere ihtiyaç vardır. Tanımlama, incelenen kaç farklı GDO'nun olduğunu ve bu GDO'ların AB ya da diğer ülkelerin kendi yönetmelikleri göz önünde bulundurularak onaylanıp onaylanmadığını belirtir. GDO'ların tanımlanması öncesinde gerekli olan unsur, onların moleküler düzeyi hakkındaki ayrıntılı bilginin olmasıdır.

Miktar Tayini: Eğer ürünler GDO içeriyorsa bir sonraki adımda örnekteki mevcut yabancı genlerin her birinin kesin miktarı belirlenmelidir ayrıca bunun eşik değerine uygunluğunun tayin edilmesidir. Ekseriyet itibariyle miktar tayininde kompetitif PCR ya da Realtime PCR uygulanır (Laura vd, 2001).

2.12.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kary Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında bulunan PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı invitro bir metottur. Bu teknik ile iki primer (hedef dizinin her iki ucuna tamamlayıcı sentetik oligonükleotitler) arasındaki hedef DNA parçası DNA polimeraz enzimi ile sıcaklık döngüleri boyunca çoğaltılır. Günümüzde PCR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya elde edilebilir.

PCR tekniğinde bir döngü; kalıp DNA'nın denatürasyonu, primer bağlanması ve primer uzaması aşamalarından oluşur. Hedef dizinin sayısı döngüler boyunca üssel olarak artar. İlk aşamada, çift zincir DNA denatürasyon sıcaklığına (~94 ºC) kadar ısıtılarak tek zincir haline getirilir. İkinci aşamada, primerlerin hedef dizilere bağlanması için sıcaklık 50-65 ºC' ye (GC içeriğine göre değişken) düşürülür. Üçüncü aşamada ise hedef diziye bağlanmış primerler optimum sıcaklıkta (72 ºC) genellikle Thermus aquaticus (Taq) DNA polimeraz enzimi tarafından uzatılır. Şekil 2.14'de görüldüğü gibi primerlerin 5' → 3' yönünde kalıp DNA'ya uygun olarak uzamasıyla hedef dizinin kopyaları oluşturulmuş olur (Somma, 2006).



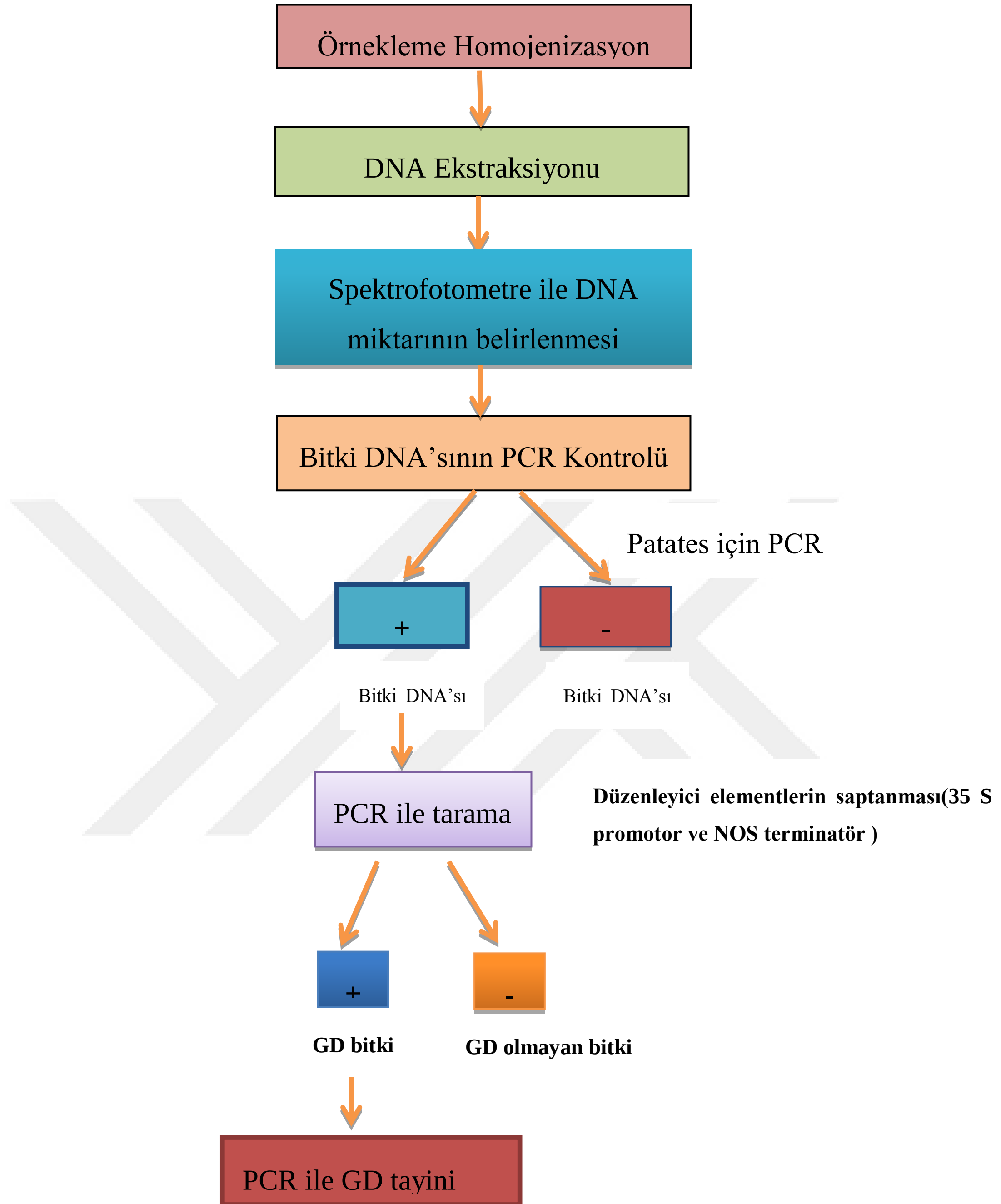
Şekil 2.14. PCR çoğaltma yöntemi(Somma ve Querci, 2010b)

2.12.3.1.Tarama Amaçlı Kalitatif PCR

Bitkiye özgü kalitatif PCR; bitkiye özgü PCR, elimizdeki bulunan DNA içinde GDO analizi yapılacak bitkinin DNA'sının olup olmadığının belirlenebilmesi için gereklidir. Yalnızca dikkat edilmesi gereken unsur, hedef bitki türüne özgü hedef gen dizisi kullanılmasıdır (Holst-Jensen vd, 2003). Mısır bitkisini tanımlamak için *Zein, Itp, Maize-Ppi, PPF, zSSIIb, Ivr1, Hmga, Adh1* genleri yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir. Lektin geni ise soya bitkisini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan hedef dizindir. Yabancı gene özgü kalitatif PCR; bitki kaynaklı gıda ve yemlerde herhangi bir yabancı genin tanımlanması, tarama yöntemi olarak adlandırılan bir yaklaşımla analiz edilen örnekte 35S promotor ve/veya NOS terminatörün varlığının PCR tekniği ile belirlenmesi gerçekleştirilir. Transgen içeren gıda ve yem maddelerinin belirlenmesini sağlamak amacıyla bugüne kadar onay almış genetiği değiştirilmiş bitkilerin hemen hemen hepsinde 35S promotor ve NOS terminatörün kullanıldığı belirlenmiştir. Son aşamada geleneksel PCR'la elde edilen PCR ürünlerinin analizi için örnekler agaroz jel elektroforez sistemi ile görüntülenir. Agaroz jel elektroforezinde jele yüklenen örnekler jelin içinde büyüklüklerine göre ayrılır ve analiz edilir (Elenis vd, 2008).

Bu tez çalışmasında aşağıda verilen şemadaki yöntemler patates ve işlenmiş patates örneklerinde PCR'la GDO sekans analizine kadar sırasıyla uygulandı. Ayrıca GDO (+) patateslerde gen kasedine özgü primerler kullanılarak PCR taraması yapıldı.

Şekil 2. 15. Çalışmada kullanılacak akış şeması





3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI

Yapılan deneysel çalışmalarda Türkiye'de ekimi yapılan 16 patates çeşidi ve marketlerdesatışı gerçekleştirilen işlenmiş patates içeren 5 adet gıda kullanıldı. Patates örnekleri Türkiye'de bulunan patates enstitülerindenve farklı işlenmişlik seviyelerine sahip gıdalar iseSamsun'daki çeşitli marketlerden satın alındı. Kullanılan gıda örnekleri Çizelge 3. 1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. GDO analizi için kullanılan örnekler

Örnek 1	Patates
Örnek 2	Patates
Örnek 3	Patates
Örnek 4	Patates
Örnek 5	Patates
Örnek 6	Patates
Örnek 7	Patates
Örnek 8	Patates
Örnek 9	Patates
Örnek 10	Patates
Örnek 11	Patates
Örnek 12	Patates
Örnek 13	Patates
Örnek 14	Patates
Örnek 15	Patates
Örnek 16	Patates
Örnek 17	İşlenmiş patates (Cips 1)
Örnek 18	İşlenmiş patates (Cips 2)
Örnek 19	İşlenmiş patates (Cips 3)
Örnek 20	İşlenmiş patates(Parmak patates 1)
Örnek 21	İşlenmiş patates(Parmak patates 2)

3.2. DNA İZOLASYONU

Patates yumruları, yapışan toprak parçacıklarından arındırmak için temiz su ile yıkandı. Yumrular, steril bıçak ile yarım parçalara ayrıldı ve bunlar da 2 yarıma kesildi; dışı kabuksuz iç küp elde edildi. İç küp, küçük dilimler halinde kesilmeden önce yeniden akan suda yıkandı. Dilimler, daha ileri analizler yapılmak üzere (-80 °C'de saklanacak) homojen beyaz toz elde etmek için sıvı azot kullanılarak öğütüldü.

DNA izolasyonu (Wulff vd, 2002) tarafından geliştirilen CTAB yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Bununla birlikte DNA izolasyonu için ticari bir kit de denendi. Patates ve işlenmiş patates ürünlerinden CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu; kalitatif PCR analizlerinde kontrol grubu olarak, kantitatif PCR analizinde ise standart eğri oluşturmak amacıyla gerçekleştirildi. İşlemlerin güvenirliğini ve tekrarlanabilirliğini kontrol etmek amacıyla DNA izolasyonu her örnek için üçer kez tekrar edildi. Olası bir kontaminasyonu engellemek için izolasyonda kullanılacak malzemeler ve çözeltiler (CTAB tamponu) 1.2 atm basınçta, 121 ºC'de, 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. İşlem sırasında ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riskine karşı örnek yerine bir tüpte su kullanılarak (izolazyon kontrolü) işlem basamakları uygulandı.

3.2.1. CTAB Yöntemi ile DNA İzolasyonu

1. Steril spatula kullanılarak, 100 mg toz örnek 65 °C'de 5 ml ekstraksiyon tamponu [100 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA (pH 8), % 2 CTAB ve 2.5 M NaCl] içeren bir tüpe aktarıldı.

2. Süspansiyona, 10 mg PVP (polivinilpirolidon, Sigma 40000) ilave edildi ve daha sonra ters çevirme yoluyla karıştırıldı. Tüpler, zaman zaman 15 dk aralıkla karıştırılarak 60 dakika su banyosunda 65 °C'de inkübe edildi.

3. Tüpler su banyosundan çıkarıldıktan sonra, oda sıcaklığına soğutuldu ve süspansiyona 0.5 ml kloroform-izoamilalkol ilave edildi. Tüpler, bir emülsiyon oluşana kadar alt üst edilerek karıştırıldı.

4. Numuneler daha sonra 20 dakika boyunca 5000 rpm'de (2500 g) santrifüje tabi tutuldu ve süpernatan yeni bir tüpe aktarıldı.

5. Süpernatan üzerine eşit hacimde kloroform-izoamilalkol (24:1) ilave edildi, iyice karıştırıldı ve 20 dakika boyunca 10,000 rpm'de (8160 g) santrifüj edildi.

6. Süpernatanta eşit miktarda soğuk izopropanol eklendi ve tüpler yavaşça alt üst edildi. Buz üzerinde en az 20 dakika inkübe edildikten sonra, numuneler DNA peletini toplamak için 5000 rpm'de (2500 g) 20 dakika santrifüje tabi tutuldu.

7. Süpernatan döküldü, pelet 100 µl % 70 etanol içinde süspansiyon halinde yıkandı; 7000 rpm'de (4000 g) 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan döküldü; pellet 40 µl TE içinde çözülerek, eşit hacimde kloroform - izoamilalkol eklendi.

8. Karışık süspansiyon, 14000 rpm'de (16000 g) 20 dakika santrifüje tabi tutuldu, süpernatan yeni bir tüpe aktarıldı ve 2 hacim % 100 soğuk etanol ilave edildi.

9. Karışım -20 °C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi, daha sonra peleti toplamak için 16000 g'de 20 dakika santrifüje tabi tutuldu. Pellet, % 70 alkolle yıkandı, daha sonra kurutularak 50 µl'lik çift damıtılmış su içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. RNA, 1 µl RNAaz A (Fermentas # EN0531) eklenerek alt üst edildi ve daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İzole edilen DNA'ların tamamı analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Kit ile DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, "ZR Plant/Seed DNA Miniprep™" (Catalog No. D6020, Zymo Research) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre aşağıdaki gibi yapıldı.

Protokol Başlangıcı

Başlamadan önce optimal performans için 100 ml **Plant/Seed DNA Binding Buffer**'a 500 µl beta-mercapto ethanol eklenir.

Zymo-Spin™ IV-HRC Spin filtresinin (yeşil kapaklı) alt kısmındaki kapalı olan kısım kırılır ve toplama tüpüne yerleştirilir. Daha sonra 8,000 x g'de 3 dk santrifüj yapılır.

Protokol

1. 150 mg bitki toz haline getirilen patates yumrusu örneği tartıldıve **ZR BashingBead™ Lysis tüp** içerisine konup 750 µl **Lysis Solution** eklendi.
2. 10 dk en yüksek devirde vorteks yapıldı.
3. **ZR BashingBead™ Lysis Tube** 13,000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
4. 400 µl süpernatant (sıvı kısım) **Zymo-Spin™ IV Spin Filtresine** (Turuncu kapaklı) transfer edildi ve 7,000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

5. Santrifüjden çıkarılan tüpün alt kısmındaki sıvıya 1200 µl **Plant/Seed DNA Binding Buffer** eklendi ve nazik bir şekilde pipet ile karışması sağlandı.
6. Karıştırdığımız sıvıdan 800 µl alınıp **Zymo-Spin™ IIC Kolonunun** olduğu toplama tüpüne transfer edildi ve 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüjden alınan tüpün alt kısmındaki sıvı döküldüve 6. Aşama tekrar edildi.
8. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen **Zymo-Spin™ IIC Kolonuna** 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** eklenir ve 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. **Zymo-Spin™ IIC kolona** 500 µl **Plant/Seed DNA Wash Buffer eklenir** ve 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Temiz bir 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne alınan **Zymo-Spin™ IIC Kolonuna** 40 µl **DNA Elution Buffer** kolonun tam merkezine gelecek şekilde eklenir ve 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Alta geçen sıvı temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filtresine** (yeşil kapaklı) transfer edildi ve 8,000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra PCR'a hazır hale getirildi.

3.3. DNA'NINKALİTE VE MİKTAR TAYİNİ

İzole edilen DNA'lar spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler kullanılarak analiz edildi.

3.3.1. Spektrofotometrik Analiz

Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların miktarının hesaplanması ve saflıklarının kontrol edilmesinde spektrofotometrik yöntem (Nanodrop, Thermo) kullanıldı. DNA'ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre yapıldı. Çift iplikli DNA molekülü için 1 optik densite (O.D.) değeri 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için DNA'ların konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA } (\mu g/ml) = A_{260} \times \text{sulandırım kat sayısı} \times 50$$

Saflık kontrolü için ise DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise genomik DNA'nın saf olduğu kabul edilir (Maniatis vd, 1982).

3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen genomik DNA'ların kalitatif analizi % 1'lik, tarama amaçlı PCR'ların analizi % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için lX Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu kullanıldı. % 1'lik jel için 0.4 g, % 2'lik jel içinse 0.8 g agaroz (Sigma, A5073), stok 50X TAE tamponunun (Çizelge 3.2) sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml lX TAE tamponuna eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika süre ile çözündürüldü.

Çizelge 3.2. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
50× TAE tamponu	2 M Tris bazı (Bioshop, TRS001.1), % 0.0571 Glasiyalasetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (Ph 8.0)
10 mg/ml EtBr	10 mg EtBr, 1 ml distile su içinde
6X Yükleme tamponu	100 mM EDTA (Ph8.0), % 1 SDS, % 60 Gliserol, % 0.03 Bromfenol mavisi, % 0.03 Ksilensiyanol FF

Oda sıcaklığında yaklaşık 60 ºC'ye kadar soğutulan jele son konsantrasyonu 0.5 ng/µl olacak şekilde 4 µl EtBr eklenip karıştırıldı. Jel tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasetine dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaşan agaroz jel, lX TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µl örnek, 1 µl yükleme boyası (Sigma, G7654) ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklenerek 80 V sabit gerilimde, markır (Biolabs, N3231S) ile birlikte 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör ile görüntülendi.

3.4. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ

İzole edilen DNA'lar CaMV 35S promotoru ve NOS terminatörü, *patatin* geni, *cry3A* geni ve higromisin (*hptII*) geninin kalitatif PCR'ında kalıp olarak kullanıldı. İşlemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini arttırmak amacıyla her örnek için PCR analizleri üçer kez tekrar edildi. Ayrıca yine bu amaç doğrultusunda her reaksiyon için pozitif, negatif ve kalıpsız kontrol grupları kullanıldı. Kullanılan kontroller aşağıda açıklanmıştır.

Pozitif kontrol: DNA izolasyonu ve PCR verimliliğini ölçmek için hedef diziyi içerdiği bilinen bir örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı. 35S, Nosve *HptII'*nin PCR'ı için bu dizileri içen transgenik tütünden izole edilmiş DNA pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Negatif kontrol: Primer özgünlüğünü ve reaksiyon hassasiyetini ölçmek için hedef diziyi içermediği bilinen bir DNA negatif kontrol olarak kullanıldı.

Kalıpsız kontrol: Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında, hedef nükleik asit dizisini taşıyan bir kontaminasyonun oluşması riskine karşı her PCR için DNA içermeyen (DNA yerine su kullanılarak) bir örnek kalıpsız kontrol olarak kullanıldı.

3.4.1. Primer Tasarımı

Higromisin fosfotransferaz direnç genini (*hptII*) tespit etmek için bu gene ait primer seti kullanılmıştır.

Patatin geni, 35S promotörü, Nos terminatörü vesentetik *cry 3A* genineait dizileri tespit etmek için kullanılan Pat-F ve Pat-R, 35S-F ve 35S-R, Nos-F ve Nos-R,3A-F ve 3A-R primer setleri, daha önceki çalışmalardan elde edilmiştir (Muwonge, 2005).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri

hedef gen	Primer	sekans (5'-3')	Pozisyon	hedef gen büyüklüğü (bp)	erişim no
HptII geni[a]	hpt-F hpt-R	gatgtaggagggcgtggata ataggtcaggctctcgctga		700	AF234296
Patatin geni[b]	Pat-F Pat-R	ctcattaggcactggcact gtaagaacttgctgcactagtc	2771-2789 2873-2894	124	X03932
35S-P[b]	35S-F 35S-R	gctcctacaaatgccatca gatagtgggattgtgcgtca	1241-1232 1389-1408	195	AF078810
Nos-T[c]	Nos-F Nos-R	gaatcctgttgccggtcttg ttatcctagtttgcgcgcta	39-58 198-218	180	U12540
Sentetik *cry3A*[d]	3A-F 3A-R	gaagggtatctccgttgtgg cagcaatgtcctctttctcgt	60-79 518-538	479	X70979

[a](Sönmezalp, 2004); [b](Jaccaud vd, 2003); [c](Donna vd, 2004); [d](Muwonge, 2005)

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İzole edilmiş patates DNA'sının iki - beş mikrolitresi (40 ng-100 ng) reaksiyon karışımına ilave edildi ve tüm PCR deneylerinde son hacim 30 µl kullanıldı. Reaksiyon karışımı, iki kez damıtılmış su, 1X PCR tamponu, MgCl2, dNTP karışımı (Fermentas # R0191), primer çifti ve Taq DNA polimeraz (Fermentas # EP0405) içeriyordu. Her bir PCR seti için, reaktif kontaminasyonunu kontrol etmek için her zaman bir reaktif (negatif) kontrolü dahil edildi. Negatif kontrol tüpünde DNA eklenmedi, bunun yerine, 30 µl reaksiyon hacmini tamamlamak için çift damıtılmış H_2O ilave edildi. Isıtma, Thermal cycler TC-412 (TECHNE, ABD) kullanılarak 0,2 ml ince duvarlı PCR tüplerinde (Axygen, ABD) yapıldı.

3.4.2.1. *Patatin* Gen PCR'ı

İzole edilen patates DNA'sının amplifiye edilebilir olup olmadığını belirlemek için *Patatin*'e özgü PCR uygulandı. Pat-F / Pat-R primer setleri patateslerde önemli bir depolama proteini olan patatin proteinini hedeflemek için kullanılmıştır. Kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları Çizelge 3.4.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. *Patatin* geni için PCR bileşenlerinin konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Hacim
dH_2O	19.6 µl
10x PCR Tamponu	3 µl 1x
25 mM MgCl2	1.8 µl (2.5 mM)
10 mM dNTP	0.6 µl (0.2mM)
Pat-F	0.4 µl (0.5 µM)
Pat-R	0.4 µl (0.5 µM)
Taq DNA polimeraz	0.2 µl (0.02 U/µl)
DNA	4 µl (80 ng)
Toplam	30 µl

Çizelge 3.5. *Patatin* geni için PCR Programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon	98 ºC	2 dk	1
Denatürasyon	95 ºC	30 sn	
Bağlanma	55 ºC	30 sn	35
Uzama	72 ºC	40 sn	
Son uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	8 ºC	∞	

3.4.2.2. *HptII* Geni İçin Tarama

HptII geninin tespiti hpt-F ve hpt-R primer setleri kullanılarak yapıldı.

Çizelge 3.6. *HptII*geni için PCR reaksiyon bileşenlerinin konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Hacim
dH_2O	19.6 µl
10x PCR Tamponu	3 µl 1x
25 mM MgCl2	1.8 µl (1.5 mM)
10 mM dNTP	0.6 µl (0.2mM)
Kn-F	0.4 µl (0.5 µM)
Kn-R	0.4 µl (0.5 µM)
Taq DNA polimeraz	0.2 µl (0.02 U/µl)
DNA	4 µl (80 ng)
Toplam	30 µl

Çizelge 3.7. *HptII* geni için PCR reaksiyon karışımı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon	95 ºC	30 sn	
Bağlanma	56 ºC	30 sn	35
Uzama	72 ºC	45 sn	
Son uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	8 ºC	∞	

3.4.2.3. 35S Promotörü için tarama

Çizelge 3.8. 35S Promotörü için PCR bileşenlerinin konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Hacim
dH_2O	20.8 µl
10x PCR Tamponu	3 µl 1x
25 mM MgCl2	3 µl (2.5 mM)
10 mM dNTP	0.6 µl (0.2mM)
35S-F	0.4 µl (0.5 µM)
35S-R	0.4 µl (0.5 µM)
Taq DNA polimeraz	0.2 µl (0.02 U/µl)
DNA	2 µl (40 ng)
Toplam	30 µl

Çizelge 3.9. 35S Promotörü için PCR programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon	95 ºC	2 dk	1
Denatürasyon	95 ºC	30 sn	
Bağlanma	54 ºC	1 dk	35
Uzama	72 ºC	1 dk	
Son uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	8 ºC	∞	

3.4.2.4. Nos terminatör için tarama

Primer set Nos-F / Nos-R, nos3 terminatör geninin tespiti ve çoğaltılması için kullanılmıştır.

Çizelge 3.10. Nos reaksiyon için PCR bileşenlerinin konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Hacim
dH_2O	18.6 µl
10x PCR Tamponu	3 µl 1x
25 mM MgCl2	4.8 µl (1.5 mM)
10 mM dNTP	0.6 µl (0.2mM)
Nos-F	0.4 µl (0.5 µM)
Nos-R	0.4 µl (0.5 µM)
Taq DNA polimeraz	0.2 µl (0.02 U/µl)
DNA	2 µl (40 ng)
Toplam	30 µl

Çizelge 3.11. Nos terminatörü için PCR programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon	95 ºC	3 dk	1
Denatürasyon	95 ºC	30 sn	
Bağlanma	55 ºC	1 dk	35
Uzama	72 ºC	1 dk	
Son uzama	72 ºC	10 dk	1
Bekleme	8 ºC	∞	

3.4.2.5. Sentetik *cry 3A* geni için tarama

2003 yılı itibariyle, onaylanmış transgenik patateslerin, Colorado patates böceğine karşı dayanıklılık sağlaması için sentetik *cry3A* geni içerir hale getirilmiştir (Bruderer vd, 2003). Sentetik *cry3A* için PCR bileşenlerinin konsantrasyonları Çizelge 3.12'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.12. Sentetik *cry3A*geni için PCR bileşenlerinin konsantrasyonları

PCR bileşenleri	**Hacim**
dH_2O	19.4 µl
10x PCR Tamponu	3 µl 1x
25 mM MgCl2	4.8 µl (1.5 mM)
10 mM dNTP	0.6 µl (0.2mM)
3A-F	0.4 µl (0.5 µM)
3A-R	0.4 µl (0.5 µM)
Taq DNA polimeraz	0.2 µl (0.02 U/µl)
DNA	3 µl (60 ng)
Toplam	30 µl

Çizelge 3.13. Sentetik *cry3A* geni için PCR programı

	Sıcaklık	**Zaman**	**Döngü**
İlk denatürasyon	98 °C	2 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	94 °C 52 °C 72 °C	30 sn 1 dk 1 dk	35
Son uzama	72 °C	10 dk	1
Bekleme	8 °C	∞	

PCR ürünlerinin analizi için % 1 agaroz kullanıldı. Agaroz jel daha önce tarif edildiği gibi hazırlandı. PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek için 100 bç.'lik veya 200 bç.'lik DNA markörü kullanıldı.





4. BULGULAR

4.1. DNA İZOLASYONU; MİKTARI VE SAFLIĞI

Türkiye'de bulunan patates enstitülerinden elde edilen farklı genotipte olan 16 patates örneğine ve Samsun marketlerinden tedarik edilen beş çeşit işlenmiş patates örneğineCTAB DNA izolasyon prosedürü uygulandı ve başarıyla DNA izole edildi. Ancak elde edilen DNA'ların konsantrasyonu, saflığı ve kalitesi gıda örneklerin çeşidine ve işlenmişlik düzeylerine göre farklılık gösterdi. Örneklerin işlenmişlik düzeyleri arttıkça elde edilen DNA'nın konsantrasyonunun ve kalitesinin azaldığı gözlendi. Spektrofotometrik ölçümler ile tüm DNA örneklerinde, DNA'nın varlığı tespit edildi (Çizelge 4.1). Buna göre, örneklerin büyük çoğunluğunun 100 ng/µl'nin üzerinde DNA içerdiği gözlendi. En düşük DNA konsantrasyonuna sahip örnek ise 32 ng/µl ile işlenmiş patates olarak belirlendi.

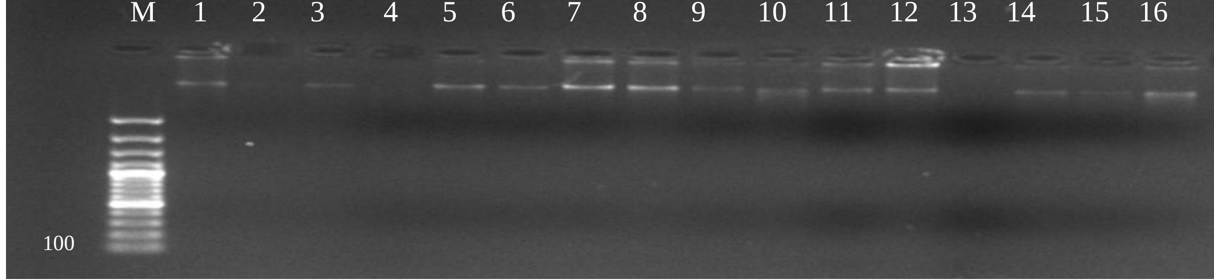
Çizelge 4.1. DNA izolasyonu ve spektrofotometrik ölçüm sonuçları

ID	Nucleic Acid Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
Örnek 1	334.6 ng/µl	6.692	3.673	1,82	0.86	DNA
Örnek 2	259.5 ng/µl	5.190	2.607	1.99	0.98	DNA
Örnek 3	282.3 ng/µl	5.646	3.259	1.87	0.62	DNA
Örnek 4	198.0 ng/µl	3.959	2.859	1.90	0.35	DNA
Örnek 5	378.1 ng/µl	7.562	4.122	1.83	0.84	DNA
Örnek 6	143.7 ng/µl	2.875	1.700	2.01	0.63	DNA
Örnek 7	324.2 ng/µl	6,483	3.479	1.86	0.84	DNA
Örnek 8	324.8 ng/µl	6.496	3.822	1.90	0.02	DNA
Örnek 9	184.7 ng/µl	3.694	2.276	1.92	0.49	DNA
Örnek 10	163.9 ng/µl	3.277	2.183	2.05	0.41	DNA
Örnek 11	248.7 ng/µl	4.973	2.989	1.96	0.56	DNA
Örnek 12	346.2 ng/µl	6.925	3.708	1.87	0.88	DNA
Örnek 13	82.9 ng/µl	1.658	1.655	2.00	0.18	DNA
Örnek 14	101.8 ng/µl	2.035	1.114	1.83	0.93	DNA
Örnek 15	179.7 ng/µl	3.594	2.525	1.92	0.37	DNA
Örnek 16	229.4 ng/µl	4.587	2.949	1.76	0.45	DNA
Örnek 17	61.7 ng/µl	1.234	0.971	1.87	0.25	DNA
Örnek 18	78.5 ng/µl	1.569	1.256	1.75	0.24	DNA
Örnek 19	42.2 ng/µl	0.845	0.868	1.67	0.15	DNA
Örnek 20	32.0 ng/µl	0.640	0.550	1.56	0.18	DNA
Örnek 21	42.6 ng/µl	0.853	0,749	1.44	0.18	DNA

Örnek 1 ptates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates,Örnek 7 paates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates,Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates.

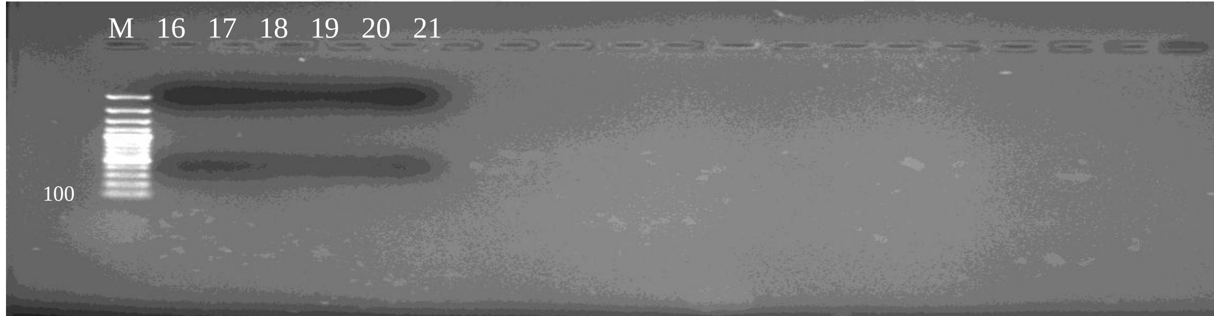
Spektrofotometre ile tüm örneklerde DNA varlığı tespit edilmesine karşın bazı örnekler agaroz jelde bant görüntüsü vermedi, bazılarında ise sürüklenme görüntüsü elde edildi (Şekil 4.1. ve 4.2.).

Şekil 4.1. Patates örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü



M: Markır, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates.

Şekil 4.2. İşlenmiş patates örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi



Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates.

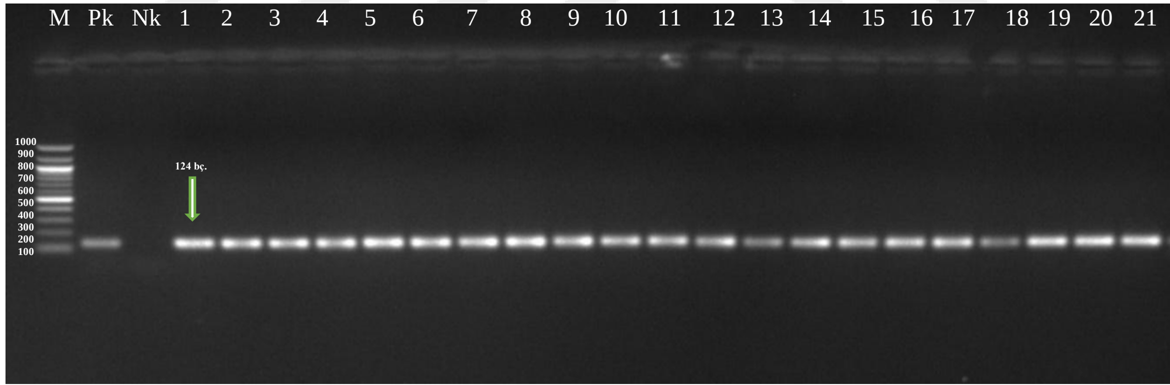
4.2. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ İLE YABANCI GEN İÇEREN ÖRNEKLERİN SAPTANMASI

Örneklerden elde edilen DNA'lar kullanılarak *patatin* geni, *hptII* direnç geni, 35S promotörü, Nos terminatörü ve sentetik *cry3A* genine ait primer çiftleriyle PCR yapıldı. Daha sonra jel elektroforezi görüntüleneri sonucunda pozitif olabilecek örnekler belirlendi (Çizelge 4.2).

4.2.1. Patatin (*Pat*) Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen *patatin* geninin PCR'ı sonucunda tüm örnekler içerisinde patates DNA'sının var olduğu ve elde edilen DNA'ların PCR için yeterli kalitede olduğu saptandı. Pat-F ve Pat-R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda patatin geninin 124 bç.'lik bir bölgesi başarıyla çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.3.). Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen *patatin* geninin PCR'ı sonucunda tüm örneklerden elde edilen DNA'ların PCR için yeterli kalitede olduğu saptandı.

Şekil 4.3. Patates örneklerinde gerçekleştirilen *patatin* genine özgü PCR sonucu

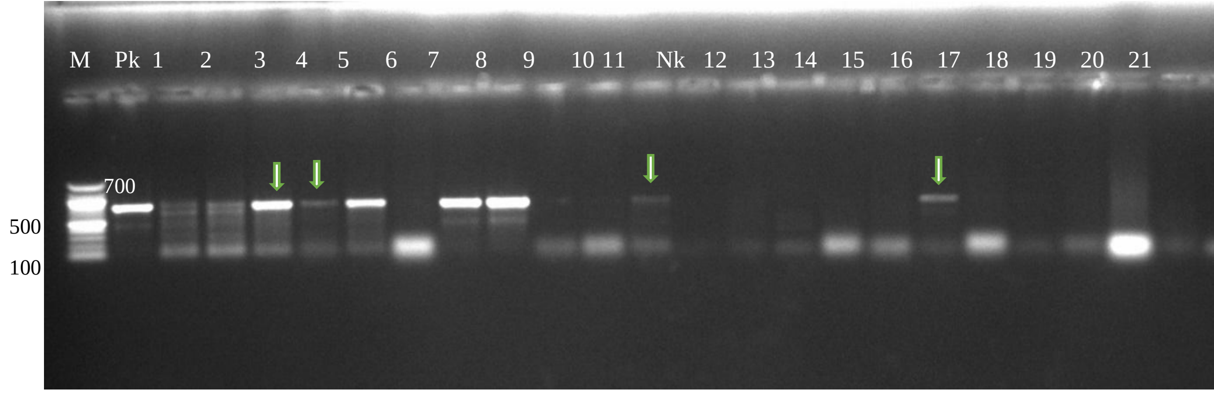


M: Markır, Pk: Pozitif kontrol, Nk: Negatif kontrol, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates.

4.2.2. *HptII*Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

HptII genine özgü primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda *HptII* geninin 700 bç.'lik bir bölgesi yedi örnekte (Örnek: 3,4,5,7,8,11,16) başarıyla çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.4.).

Şekil 4.4. Patates örneklerinde gerçekleştirilen *HptII* genine özgü PCR sonucu

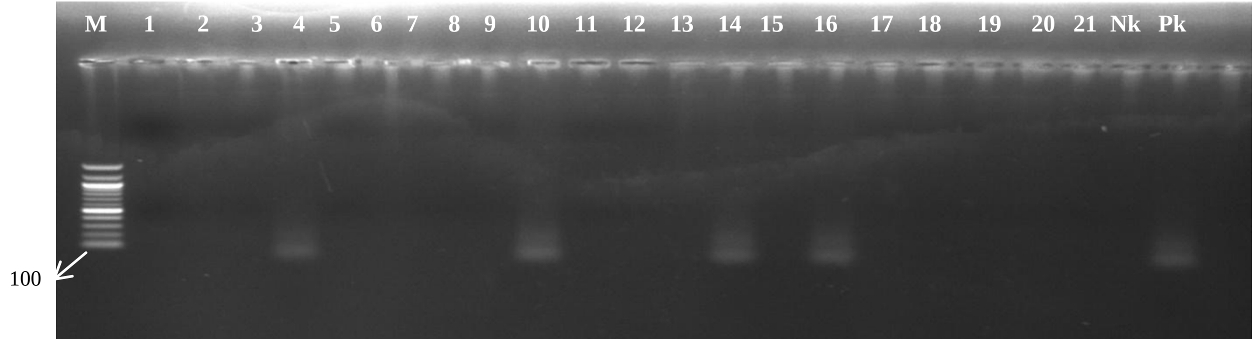


M: Markır, Pk: Pozitif konrol, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Nk: Negatif kontrol, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 patates, Örnek 18 patates, Örnek 19 patates, Örnek 20 patates, Örnek 21 patates.

4.2.3. 35S Promotörü ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

35S-F ve 35S-R primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda hiçbir örnekte 35S promotörü varlığı saptanamadı. (Şekil 4.5.).

Şekil 4.5. Patates örneklerinde gerçekleştirilen 35S promotörüne özgü PCR sonucu

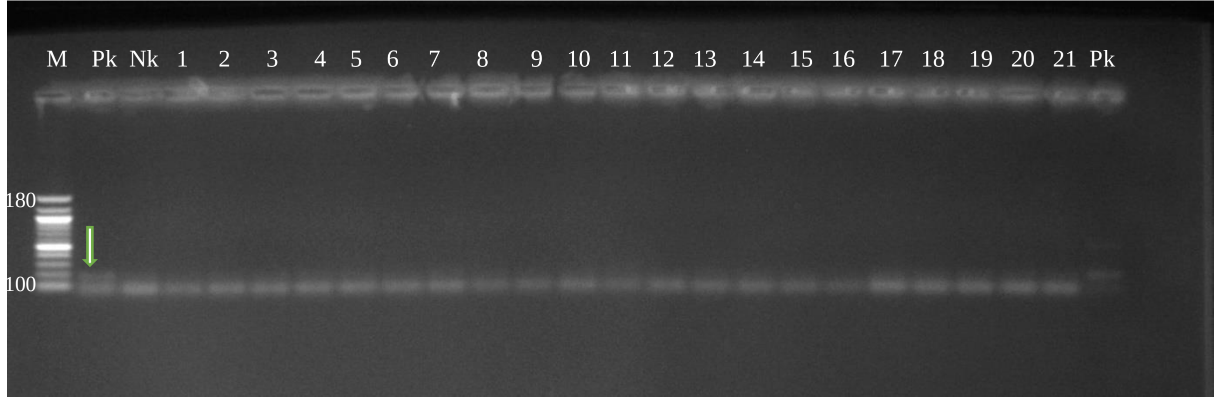


M: Markır, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates, Nk: Negatif kontrol, Pk: Pozitif kontrol.

Örneklerde Nos-R ve Nos-F primerleri kullanılarak gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR sonucunda hiçbir örnekte Nos dizisinin varlığı saptanamadı. % 0.1-5 SRM'ler (pozitif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen büyüklükte bant (180 bç.) elde edilmesi bu durumun, PCR karışımından ya da PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun

olmadığını göstermektedir. Şekil 4.6'daNos-R ve Nos-F primer çifti ile yapılan PCR'a ait örnek agaroz jel görüntüsü verildi.

Şekil 4.6. Patates örneklerinde gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR sonucu

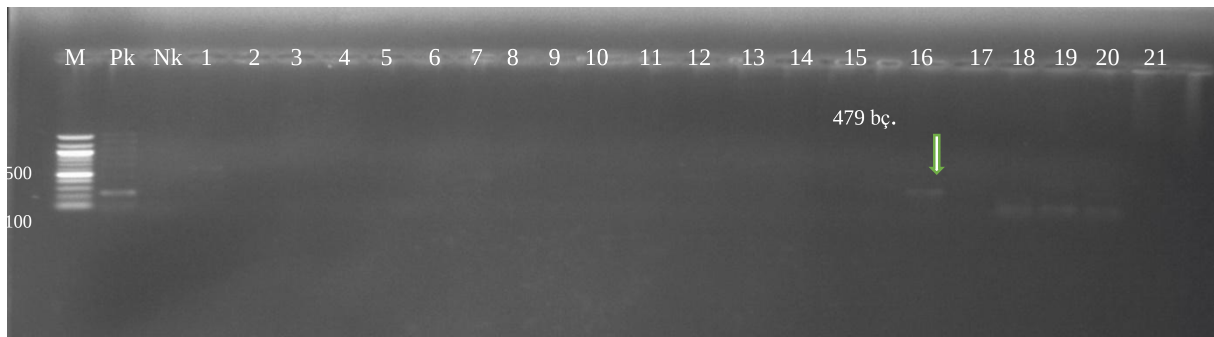


M: Markır, Pk: pozitif kontrol, Nk: negatif kontrol, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates.

4.2.4. *Cry3A* Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

3A-F ve 3A-R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda 1 örnekte (Örnek:16) beklenen yaklaşık 479 bç.'lik bir bölgenin çoğaltılabilmesiyle *cry3A* geninin varlığı agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.7).

Şekil 4.7. Patates örneklerinde gerçekleştirilen *cry3A* genine özgü PCR sonucu



M: Markır, Pk: Pozitif kontrol, Nk: Negatif kontrol, Örnek 1 patates, Örnek 2 patates, Örnek 3 patates, Örnek 4 patates, Örnek 5 patates, Örnek 6 patates, Örnek 7 patates, Örnek 8 patates, Örnek 9 patates, Örnek 10 patates, Örnek 11 patates, Örnek 12 patates, Örnek 13 patates, Örnek 14 patates, Örnek 15 patates, Örnek 16 patates, Örnek 17 işlenmiş patates, Örnek 18 işlenmiş patates, Örnek 19 işlenmiş patates, Örnek 20 işlenmiş patates, Örnek 21 işlenmiş patates.

Çizelge 4.2. Kalitatif PCR sonuçları

ID	Örnek	*Patatin*	*HptII*	*P-35S*	*T-Nos*	*Cry3A*
1	Patates	+	-	-	-	-
2	Patates	+	-	-	-	-
3	Patates	+	+	-	-	-
4	Patates	+	+	-	-	-
5	Patates	+	+	-	-	-
6	Patates	+	-	-	-	-
7	Patates	+	+	-	-	-
8	Patates	+	+	-	-	-
9	Patates	+	-	-	-	-
10	Patates	+	-	-	-	-
11	Patates	+	+	-	-	-
12	Patates	+	-	-	-	-
13	Patates	+	-	-	-	-
14	Patates	+	-	-	-	-
15	Patates	+	-	-	-	-
16	Patates	+	+	-	-	+
17	Patates	+	-	-	-	-
18	Patates	+	-	-	-	-
19	Patates	+	-	-	-	-
20	Patates	+	-	-	-	-
21	Patates	+	-	-	-	-
Pozitif kontrol		+	+	+	+	+
Negatif Kontrol		-	-	-	-	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetiği değiştirilmiş gıdalar yirmi yılı aşkın süredir küresel çapta marketlerde satılmaya başlanmış ve kullanımı da hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak elde edilen ürünlerin insan sağlığı, biyoçeşitlilik ve çevre üzerine olumsuz etkisi hususunda endişeler oluşmasına neden olmuştur. Bu ise, GDO'lu ürünlerin üretiminden tüketimine kadar geçen tüm aşamaların hassas bir şekilde incelenip kontrol edilmesi, risk değerlendirmelerinin yapılması ve gerektiği koşullarda etiketlendirilmesi, tüketimini tüketicinin tercihine bırakılması gibi, birden çok önlemin alınmasını gerekli kılmıştır. Bu anlamda birçok düzenlemenin yapılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Piyasaya sürülmüş gıda ürünlerinde GDO analizlerinin yapılması için, laboratuvar alt yapıları güçlendirilmeli ve etiketleme ile ilgili düzenlemeler uygulanmalı. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan yönetmeliğin uygulanabilir hale getirilmesi gerekmektedir. Etiketleme ile tüketiciye seçme hakkı verilmesine karşın, biyoçeşitliliğin tekelleşmesiyle tek tip ürüne bağımlı kalacak tüketici için seçme hakkından bahsetmek gelecekte olanaksız hale gelecektir (Korkut ve Soysal, 2013).

Ülkemizde 26 Mart 2010 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Biyogüvenlik Kanunu'nun esaslarına göre genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında kullanılması yasaklanmıştır (Anonim, 2010). Bu nedenle GDO tanısı Türkiye'de zorunlu hale gelmiştir.

Türkiye'de,önem derecesine göre, patatesdiğer ürünler arasında 4. sırada yer almaktadır (FAO, 1998). Birkaç formda tüketilir ve piyasada patateslerden işlenmiş çok sayıda fast food ürünü mevcuttur. Mevcut bilgiler, Türkiye'nin patates tohum ticaret ortaklarının Romanya, ABD, İsrail ve Kanada'yı içerdiğini ve bu ortak ülkelerde GD patateslerinin ekimi için onaylandığını gösteriyor. 2003 yılı itibarıyla, yayınlanan bilgiler, Kolorado patates böceğine direnç kazandıran sentetik *cry3A* geninin onaylanmış tüm transgenik patates soylarına dönüştüğünü göstermektedir (Bruderer vd, 2003).

Bu çalışma, genetiği değiştirilmiş patateslerin ve ürünlerinin Türk gıda pazarında bulunup bulunmadığını, DNA tabanlı PCR yöntemi ile tespit etmeyi amaçlamaktadır.

Ülkemizde ekimi yapılan patatesler Türkiye bulunan patates enstitülerinden, farklı işlenmişlik seviyelerine sahip gıda türleri ve markaları ise analiz edilmek üzere çeşitli

marketlerden satın alındı, yabancı gen içerikleri bakımından tarandı. Genetik değişimi belirlenen örneklerde ileri kalitatif analizler yapılarak içerdikleri GDO çeşitleri belirlendi.

DNA izolasyonları CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmesi sonucunda, elde edilen DNA'ların miktarının, saflığının ve kalitesinin işlenmişlik düzeyine göre değiştiği ve özellikle işlenmişlik düzeyleri diğer gruplara göre daha fazla olan gıda örneklerinden elde edilen DNA'ların kalitesinin daha düşük olduğu gözlendi. Absorbsiyon oranının (260/280) 1.80'den düşük olduğu ölçümler DNA'daki proteinin, 2.0'den yüksek olduğu ölçümler ise RNA'nın uzaklaştırılamamasından kaynaklandığını gösterir (Yoke-Kqueen vd, 2011). Bu çalışma, DNA miktarları tüm örneklerden farklı konsantrasyonlarda da olsa CTAB DNA izolasyon yönteminin farklı işlenmişlik düzeyindeki örneklerde güvenle kullanılabilen bir yöntem olduğunu göstermektedir.

CTAB yöntemi bitkisel materyal ve gıdalarda, polisakkaritlerin DNA'dan uzaklaştırılmasında kullanılan etkili bir yöntemdir. Bir ekstraksiyon yönteminin verimliliği DNA'nın saflık durumu ve elde edilen miktarı olarak değerlendirilmektedir (Mafra vd, 2008).

PCR'a dayalı GDO analiz çalışmalarında CTAB DNA izolasyon yönteminin başarıyla kullanıldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Keskin, (2014) tarafından ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada soya ve mısır içerikli işlenmiş gıdalardan CTAB yöntemi ile başarılı şekilde DNA izole edilmiştir (Keskin, 2014). Gryson, (2004) tarafından soya içeren ileri düzeyde işlenmiş gıdalarda 5 farklı izolasyon yöntemi karşılaştırılmış ve CTAB yönteminin uygulamada uzun zaman almasına karşın en etkili izolasyon yöntemi olduğunu belirtmişlerdir (Gryson vd, 2004).

PCR, GDO analizinde yaygın bir biçimde kullanılan en önemli moleküler yöntemlerdendir. Güvenilir, yüksek duyarlılıkta ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olduğundan dolayı PCR, genetiği değiştirilmiş birçok ürünün analizinde kullanılmaktadır.

Muwonge, (2005) tarafından patates ve işlenmiş ürünlerinde CTAB yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde DNA izolasyonu yapılmış, PCR yöntemi ile de genetiği değiştirilmiş ürün tespit edilmiştir (Muwonge, 2005).

Bu çalışmada, patates ve işlenmiş patates örneklerinde yabanci genlerin varlığı, Avrupa Birliği tarafından onaylanmış pek çok transgenik ürünlerde bulunan düzenleyici diziler olan CaMV 35S promotörü, *A. tumefaciens* nos terminatörü, sentetik *cry3A* geni, *patatin* geni, *hptII* direnç geni dizileri ve bu dizilere özgü primerler kalitatif PCR analizleriyle araştırıldı.

İlk PCR testinin *Patatin* geninin primerlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmesi, ekstre edilen patates DNA'larının amplifiye olup olmadığını saptamaya izin verdi. Tüm patates örnekleri, DNA'larının amplifiye olabileceğini ve PCR analizleriyle çalışabileceğini 124 bç.'lik bölgenin oluşmasıyla gösterdi. Patatin primer setinin spesifitesi, diğer bitkilerden alınan DNA kullanılarak değerlendirildi ve bu primerlerin sadece genomu *patatin* geni içeren patatese spesifik olduğunu gösterdi. Bu ise, kullanılan tütün DNA'sında beklenen bölgenin elde edilememesi nedeniyle yansıtıldı. Bitki spesifik PCR, özellikle birden fazla bitki türü içeren malzemelerle, çalışmanız durumunda önemlidir. Elde edilen bu bulgular Muwonge, (2005) tarafından yapılmış, patates bitkisinde GDO analizleri, çalışması ile benzeşmektedir.

Higromisin (*hptII*) dizisinin varlığını belirlemek amacıyla yapılan kalıtatif PCR'lar sonucunda patates ve işlenmiş patates ürünlerinin 7 tanesinin (Örnek: 3,4,5,7,8,11,16) *hpt* geni içerdiği düşünülmektedir. PCR analizi tekrarlanmış ve benzer bulgular elde edilmiştir. Higromisin, gen aktarımlarında seçici markır gen olarak kullanılmaktadır (Woo vd, 2015). Bununla birlikte kesin bir sonuç elde edebilmek için DNA örnekleri izole edildikten sonra sekans analizine gönderilmek zorundadır.

35S dizisinin belirlenmesine yönelik yapılan kalitatif PCR sonuçlarına göre örneklerin hiçbirinde 35S promotörü dizisinin varlığı belirlenememiştir. 35S promotörü GDO çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hedef bir dizidir. 35S dizisi hemen hemen tüm transgenik ürünlerde gen anlatımının tamamlanmasını sağlayan düzenleyici dizi olarak kullanıldığı için, GDO tarama çalışmalarında güvenilir ve çok kullanışlı genetik bir elementtir. Nitekim bir çok çalışmada transgenik ürünlerin belirlenmesi için kullanılmıştır (Muwonge, 2005; Öztürk, 2011; Meriç, 2012; Mutlu, 2016). Ancak ihtimali bir durum olarak da, bu çalışmada kullanılan primerler ile 35S promotör dizilerinin ortaya çıkmamasının sebebi, farklı promotör dizilerinin kullanılmış olması alabilir.

Nos dizisinin varlığını belirlemeye yönelik yapılan kalitatif PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin hiçbirinde nos dizisinin varlığı belirlenemedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan trangenik tütün materyalinden istenilen büyüklükte bantın elde edilmesi (Şekil: 4.6) bu durumun PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını gösterdi. Bu çalışmada kullanılan primerler ile nos terminatör dizilerinin ortaya çıkmamasının sebebi, farklı terminatör dizilerinin kullanılmış olmasıihtimalinden kaynaklanabilir. Bu sonuç Arvas, (2017) tarafından tespit edilmiş sonuçlarla örtüşmektedir.

Sentetik *cry3A* geninin belirlenmesi amacıyla yapılan kalitatif PCR sonucuna göre; sadece 1 örneğin (Örnek: 16) beklenen 479 bç.'lik bir bölgesinin çoğaltılması nedeniyle *cry3A* gen dizisini içerdiği düşünülmektedir. Muwonge, (2005) tarafından yapılan çalışmada 32 örnekten 10 tanesinde, bu çalışmada ise; 21 örnekten 1 tanesinde *cry3A* dizisinin varlığı tespit edilebildi. Sentetik *cry3A* geni içeren örnekler böceklere dirençli patates çizgilerinde sınıflandırılabilir (Muwonge, 2005). Sentetik *cry3A*'nın saptanması şimdiye kadar onaylanmış transgenik patates soylarının spesifik karakterizasyonuna izin vermiştir (Bruderer vd, 2003). Bununla birlikte kesin bir sonuç elde edebilmek için DNA örnekleri izole edildikten sonra sekans analizine gönderilmek zorundadır.

Bazı örneklerde, onaylanmış GD ürünlerinin birden fazlasında *hptII* geni büyüklüğünde fragmantlartespit edildi. Buna ek olarak, GD patates soylarından bir tanesinde dönüştürülmüş *sentetik cry3A* olduğu düşünülen DNA tespit edildi. Elde edilen tüm PCR sonuçlarının özeti Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

Örnek 16'da sadece *hpt*II ve sentetik cry3A genlerioIduğu düşünülen fargmantlar elde edildi. GD patates soylarını geliştirirken; *hpt*II, 35S terminatör, nos terminatör genleri sentetik cry3A geni ile birlikte aktarıldığından, bu numunelerde P-35S ve T-Nos'u da tespit etmeyi umduk. Yukarıda daha önce de bildirildiği üzere, farklı promotör ve terminatör kullanılmış olabilir (Anklam vd, 2002).

Toplam 21 patates örneğinden, 1 örnekte (16) sentetik *cry3A* geni, 7 örnekte de *hptII* (3,4,5,7,8,11,16) olduğu düşünülen DNA'lar tespit edildi. Bu örneklerde T-Nos tespit edilmemesi, transgenik olmadığının göstergesi değildir. Çünkü *hptII* ve T-Nos ve 35S promotör sadece sentetik *cry3A* veya başka bir transgenin varlığı için göstergelerdir.

T-Nos3, P-35S, *hptII* ve sentetik *cry3A* genleri örnek 1,2,6,9,12,13,17,18,19,20,21'de algılanmadı. Bu çalışmada araştırılan P-35S, T-Nos, *hptII,* sentetik *cry3A* yerine patates soylarına aktarılan diğer bazı genetik elementler olmadıkça, bu numuneler transgenik olmaz.

Bu tez çalışmasıyla elde edilen bulgular, gıda pazarında GD patateslerin var olabileceğini göstermiştir. Ancak sekans analizi yapılmadan yabancı genin varlığı tam olarak ispat edilemez. Aynı zamanda sekans analizi sonucu olumlu çıksa bile Real-Time PCR ile miktar tayin edildikten sonra ürünün GDO'lu olup-olmadığı kabul edilebilir. Bu ise,Biyogüvenlik Kanunu gereğince, ülkemizde GDO'ların etiketlenmesi ve izlenmesi ile ilgili daha hassas denetimlerin gerekliliğini düşündürmektedir. Çalışmanın sonucunda

GDO'lu olabileceği belirtilen gıdalarda, transgenik patates çeşitlerinin ticari tiplerinin ayırt edilebilmesi için spesifik PCR analizleri için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.





KAYNAKLAR

Aksoy, F. (2006). Lise Öğretmenlerinin Genetiği Değiştirilmiş Gıdalara İlişkin Bilgi Düzeyleri, Görüşleri ve Bilgilendirilme İhtiyaçlarının Belirlenmesi: Adana Örneği. *Ankara Üniversitesi biyoteknoloji Enstitüsü, Sosyo-Ekonomik Gelişme ve Biyoteknoloji, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, 119s., Ankara.*

Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H. and Van Den Eede G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214(1): 3-26.

Anonim, (2000). (DPT) Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Kırsal Kalkınma Özel İhtisas Komisyonu Raporu. (975192541X).

Anonim, (2014). *(AFAD) 2014-2023 Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmaların Biyogüvenliği Yol Haritası*. Retrieved from Ankara.

Anonymous, (2007). (EFSA) European Food Safety Authority; Statement of the scientific panel on genetically modified organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants, Parma: European Food Safety Authority. Retrieved from http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/gmo_statement_nptII_.pdf (Erişim Tarihi, 21.07.2015).

Anonymous, (2013). Simplot. 2013. Petition for determination of nonregulated status for innate potatoes with low acrylamide potential and reduced black spot bruise: events E12 and E24 (Russet Burbank); F10 and F37 (Ranger Russet); J3, J55, and J78 (Atlantic); G11(G); H37 and H50 (H). J.R. Simplot Company.

Arı, Ş. (2004). *Bitki Biyoteknolojisi*. S.Ü. Basımevi, 160-189., Konya, Türkiye.

Arı, Ş. (2011). GDO Nedir.Retrieved from http://biyogem.istanbul.edu.tr/?page_id=6687 [Erişim Tarihi: 07.12.2017]. from İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendis Uygulama ve Araştırma Merkezi http://biyogem.istanbul.edu.tr/?page_id=6687

Arslan, K. ve Akyüz, B. (2009). Gen transfer teknolojileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 6(1).

Arvas, Y. E. (2017). Türkiye'deki Yabancı Çeltik Ve İşlenmiş Çeltik Ürünlerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarla İlgili Genetik Analizler. Yüksek Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Aslan, D. ve Şengelen, M. (2010). Farklı boyutlarıyla genetiği değiştirilmiş organizmalar. *Ankara: Ankara Tabip Odası. Celen, E.(2014). Türkiye'deki Biyogüvenlik Yasasının Etkilerinin Değerlendirilmesi. Aydın*

Atsan, T. ve Kaya, T. E. (2008). Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) tarım ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(2).

Aydın, H. (2012). *Sağlıklı Nesiller için Önce Sağlıklı Tohum*. İstanbul Ticaret Odası Yayınları, İstanbul.

Azadi, H. ve Ho, P. (2010). Genetically modified and organic crops in developing countries: A review of options for food security. *Biotechnology advances,* 28(1): 160-168.

Babaoğlu, M. (1999). Bitkilerde gen transferi teknikleri. *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi,* 322: 24-26.

Bachem, C. W., Speckmann, G. J., van der Linde, P. C., Verheggen, F. T., Hunt, M. D., Steffens, J. C. and Zabeau, M. (1994). Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Nature biotechnology,* 12(11): 1101-1105.

Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiß, J., Meksem, K., Bormann, C. A., Oberhagemann, P., Gebhardt, C. (2002). The R1 gene for potato resistance to late blight (Phytophthora infestans) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *The Plant Journal,* 30(3): 361-371.

Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., and Pleau, M. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology,* 25(11): 1322-1326.

Becalski, A., Lau, B. P-Y., Lewis, D. and Seaman, S. W. (2003). Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 51(3): 802-808.

Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. (2000). Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *The Plant Journal,* 21(1): 73-81.

Benzing-Purdie, L. M., Ripmeester, J. A. and Ratcliffe, C. I. (1985). Effects of temperature on Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 33(1): 31-33.

Berksan, Ö. F. (2002). *Patates Tarımı* Kâr Tarım, Ankara.

Bhaskar, P. B., Wu, L., Busse, J. S., Whitty, B. R., Hamernik, A. J., Jansky, S. H., and Jiang, J, (2010). Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant physiology,* 154(2): 939-948.

Bouwmeester, K., Han, M., Blanco- Portales, R., Song, W., Weide, R., Guo, L. Y., and Govers, F. (2014). The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK- I. 9 enhances resistance to Phytophthora infestans in Solanaceous plants. *Plant Biotechnology Journal,* 12(1): 10-16.

Brady, C., McGlasson, W., Pearson, J., Meldrum, S. and Kopeliovitch, E. (1985). Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA).*

Brown, C. (2005). Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research,* 82(2): 163-172.

Brown, C. (2008). Breeding for phytonutrient enhancement of potato. *American Journal of Potato Research,* 85(4): 298.

Brown,C., Edwards, C., Yang C-P and Dean, B. (1993). Orange flesh trait in potato: Inheritance and carotenoid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(1): 145-150.

Bruderer, S., Leitner, K. E and Lindenmeyer, J. (2003). Genetically Modified (GM) crops: molecular and regulatory details. *Basel, Švica, BATS, Centre for biosafety and sustainability (http://www. bats. ch/gmo-watch/).*

Budd, R. (1991). Biotechnology İn The 20th Century . *Social Studies Of Science,*, 21 (3): 415-457.

Bulley, S., Wright, M., Rommens, C., Yan, H., Rassam, M., Lin- Wang, K. and Allan, A. C. (2012). Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over- expression of the l- galactose pathway gene GDP- l- galactose phosphorylase. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4): 390-397.

Cabello, R., De Mendiburu, F., Bonierbale, M., Monneveux, P., Roca, W. and Chujoy, E. (2012). Large-scale evaluation of potato improved varieties, genetic stocks and landraces for drought tolerance. *American Journal of Potato Research*, 89(5): 400-410.

Caligari, P. (1992). Breeding new varieties in the potato crop. The scientific basis for improvement. Harris, PM Ed: London: Chapman and Hall.

Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11): 3426-3431.

Chawla, R., Shakya, R. and Rommens, C, M. (2012). Tuber- specific silencing of asparagine synthetase- 1 reduces the acrylamide- forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnology Journal*, 10(8): 913-924.

Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J. and Tumer, N. (2001). Control of enzymatic browning in potato (Solanum tuberosum L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 652-657.

Çelik,V., Balık, D. T. (2016). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)/Genetıcally Modıfied Organısms (GMO). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 23(1-2).

Çetiner, S. (2010). Genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) nedir? sorular ve yanıtlar-1. *Uluslararası Ekonomik Sorunlar Dergisi,* 10(39): 13-26.Retrieved from Retrieved from https://research.sabanciuniv.edu/18128/2/D%C4%B1%C5%9Fi%C5%9Fleri_Dergisi_2.pdf.

De La Riva, G. A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R. and Ayra-Pardo, C. (1998). Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3): 24-25.

Delobel, C., Moens, W., Querci, M., Mazzara, M., Cordeil, S. and Van Den Eede, G. (2012). Maize seeds sampling and DNA extraction; report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds and grains. *European commission, Directorate General-joint research centre institute for health and consumer protection (IHCP). Biotechnology and GMOs unit. Website*

www. gmo-crl. jrc. ec. europa. eu/summaries/3272_DNAExtrReport. pdf Retreived: 10-11.

Demir, A., Seyis, F. ve Kurt, O (2006). Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar: I. *Bitkiler. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi,* 21(2): 249-260.

Demir, A., Seyis, F. ve Kurt, O. (2012). Genetik Yapisi Değiştirilmiş Organizmalar: I. Bitkiler.

Donna, S. S., Philip, W. M. and Solke, H. D. (2004). Method for the detection of synthetic cry3A in transgenic potatoes. *Journal Agric. Food Chem.*, 52: 809-815.

Duan, H., Richael, C. and Rommens, C. M. (2012). Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eva1 elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1. *Transgenic research*, 21(5): 929-938.

Economic, U N D O (2007). *World population prospects: The 2006 revision*. United Nations Publications.

Elenis, D. S., Kalogianni, D. P., Glynou, K., Ioannou, P. C. and Christopoulos, T. K. (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry,* 392(3): 347-354.

Ergin, S. Ö., Yaman, H.(2013). GenetiğiDeğiştirilmişGidalar Ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*: 261

Erzincanlı, H. O. (2006). Tarımda genetik olarak değiştirilmiş organizmalar ve bunların belgelendirilmesi. Ege Üniversitesi

Fagan, J. B. and John, B. (2005). Genetically engineered food-a serious health risk. *Genetically Engineered Foods. URL: http://userwww. sfsu. edu/~ rone/GE,* 20.

FAO I (1998). UNEP and CIP 1998. *Soil and terrain digital database for Latin America and the Caribbean at 1: 5 million scale.*

Faostat (2015, 2015). Area harvested and production quantitiy of potatoes. Retrieved from http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.

Federica D L and Francesca D L (2005). Traceabılıty and Detectıon of Genetıcally Modıfıed Organisms in the Labelling of Food Productıon Chain, EU Directi. 9th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later.

Foster, S. J., Park, T. H., Pel, M., Brigneti, G., Śliwka, J., Jagger, L., Jones, J. D. (2009). Rpi-vnt1. 1, a Tm-22 homolog from Solanum venturii, confers resistance to potato late blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5): 589-600.

Friedman, M., Lee, K. R., Kim, H. J., Lee, I. S. and Kozukue, N. (2005). Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15): 6162-6169.

Gözükırmızı, N. (2008). Biyoloji Araştırmaları, Moleküler Boyutu ve Önceliklerimiz. Retrieved from

http://maycalistaylari.comu.edu.tr/calistay2008/sunumlar/konferans/nermingozukirmizi2.pdf.

Gözükırmızı, N. (2014). *"Bitki Biyoteknolojisi"*. Nobel Yayıncılık, ss.393 - 414, Kızılay, Ankara.

Gregory, P., Sinden, S. L., Osman, S. F., Tingey, W. M. and Chessin, D. A. (1981). Glycoalkaloids of wild, tuber-bearing Solanum species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6): 1212-1215.

Gryson, N., Messens, K. and Dewettinck, K. (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11): 1357-1363.

Gupta, M., Ram, R. (2004). *The GMO Handbook*. Springer, 219-241.

Halterman, D., Guenthner, J., Collinge, S., Butler, N. and Douches, D. (2016). Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato. *American Journal of Potato Research*, 93(1): 1-20.

Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C. and Tanksley, S. D. (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18): 9975-9979.

Han, K. H., Matsumoto, A., Shimada K. İ., Sekikawa, M. and Fukushima, M. (2007). Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 98(5): 914-92.

Haspolat, I. (2004). Genetik Olarak Değiştirilmiş Ürünlerin Üretimi, Ticareti ve Ticaretin Düzenlenmesi. *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Sosyo-Ekonomik Gelişme ve Biyoteknoloji, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, 157s., Ankara.*

Hatunoğlu, E. E. (2010). *Biyoyakıt politikalarının tarım sektörüne etkileri*.

Hayashi, K., Hibasami, H., Murakami, T., Terahara, N., Mori, M. and Tsukui, A. (2006). Induction of apoptosis in cultured human stomach cancer cells by potato anthocyanins and its inhibitory effects on growth of stomach cancer in mice. *Food science and technology research*, 12(1): 22-26.

HeřmanoVá, V., Bárta, J. and Čurn, V. (2007). Wild potato species: characterization and biological potential for potato breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 43(3): 73-81.

Hijmans, R. J. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*, 80(4): 271-279.

Hirsch, C. N., Hirsch, C. D., Felcher, K., Coombs, J., Zarka, D., Van Deynze, A., Bethke, P. (2013). Retrospective view of North American potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding in the 20th and 21st centuries. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(6): 1003-1013.

Hobson, G. (1965). The ripening of tomato fruit as affected by the injection of certain chemicals. *Journal of Experimental Botany*, 16(3): 411-422.

Hoffmann, T. (1997). Gentransfer bei höheren Pflanzen. *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. *Parey Bucherverlag, Berlin*: 275-323.

Holmes, C. (2008). *Seeds, scientists & genetically modified organisms: Genetic engineering practices and global connections*. ProQuest.

Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A. and Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375(8): 985-993.

https://sites.google.com/site/iemgec/final-project/maria-a. History Of Potato Plant History Of The World.

Huamán, Z. and Spooner, D. M (2002). Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (Solanum sect. Petota). *American Journal of Botany*, 89(6): 947-965.

Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. and Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39): 14302-14306.

Hur, J., Jung, K. H., Lee, C. H. and An, G. (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*, 167(3): 417-426.

ISAAA, (2016). Gobal status of commercialized biotech/GM crops.Retrieved from https://www.google.com/url?q=http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/&sa=U&ved=0ahUKEwi0qaOb5dDTAhWGmBoKHTJNBEcQFggJMAI&client=internal-uds-cse&usg=AFQjCNEE6j-2_Mcq6d6NIjcmYWAA4VASVg.

Jaccaud, E., Höhne M. and Meyer, R. (2003). Assessment of screening methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 550-557.

Jahan, S. N., Åsman, A. K., Corcoran, P., Fogelqvist, J., Vetukuri, R. R. and Dixelius, C. (2015). Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen Phytophthora infestans. *Journal of Experimental Botany*, 66(9): 2785-2794.

James, C. (2016, 2013). 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015. Retrieved from Retrieved from www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropevents/default.asp?cropıd=18.

Jansky, S. (2000). *Breeding for disease resistance in potato. Plant Breeding Reviews. vol. 19* (0471387878).

Jones, D. A., Thomas C M, Hammond-Kosack K E, Balint-Kurti P J and Jones J D (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to Cladosporium fulvum by transposon tagging. *Science-New York Then Washington-*: 789-789.

Jung, S., Chung, J. S., Chon,S. U., Kuk, Y. I., Lee, H. J., Guh, J. O. and Back, K. (2004). Expression of recombinant protoporphyrinogen oxidase influences growth and morphological characteristics in transgenic rice. *Plant growth regulation*, 42(3): 283-288.

Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F. and Jahn, M. M. (2005). The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *The Plant Journal*, 42(3): 392-405

Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D. G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R. and Adams, M. J. (2005). Evidence that the recessive bymovirus resistance locus rym4 in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular Plant Pathology*, 6(4): 449-458.

Karagöz, A. (2010). *Farklı BoyutlarıylaGenetiği Değiştirilmiş Organizmalar Ankara Tabip Odası*, 15-21, Ankara.

Kaya, Y. (2015). Genetically modified plants and their biosecurity risks. Halal and Tayyip Products Fiqh, Medicine Pharmaceuticals, Cosmetics and Tourisms Workshop. *Gimdes.*

Kempken, (2004). Gentechnik bei Pflanzen. , Berlin: Springer Verlag.

Keskin, H. (2014). İşlenmiş Gıda Ürünlerinde Genetiği Değiştirilmiş (Gd) Ürünlerin ve Uygun Dna İzolasyonu Metodunun Belirlenmesi Yüksek Lisans (Yayınlanmamış Tez) Yüksek Lisans, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji, Karaman.

Kierzkowski, D., Kmieciak, M., Piontek, P., Wojtaszek, P., Szweykowska- Kulinska, Z. and Jarmolowski, A. (2009). The Arabidopsis CBP20 targets the cap- binding complex to the nucleus, and is stabilized by CBP80. *The Plant Journal*, 59(5): 814-825.

Kıvılcım, Z. (2012). Cartagena protokolü ve Türkiye biyogüvenlik mevzuatı.

Korkut, D. ve Soysal, A. (2013). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar. *Ankara: Halk Sağlığı Uzmanları Derneği (HASUDER). Lönnerdal, B.(2003). Genetically Modified Plants for Improved Trace Element Nutrition.(133), 1430*, 1433.

Korth, K. L. (2008a). *Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik* Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık, 193-216. .

Korth, K. L. (2008b). *Transgenik Bitkilerle İlgili Genler ve Özellikler, Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik* (Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti.), Bölüm 8: 193-216,

Kramer, M., Sanders, R., Bolkan, H., Waters, C., Sheeny, R. E. and Hiatt, W. R. (1992). Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 1(3): 241-255.

Kramer, M. G. and Redenbaugh, K. (1994). Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica*, 79(3): 293-297.

Laura, B., Petra. H., Simon, K. and Van den Eede, G. (2001). Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre. *Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, Ispra. http://www. osservaogm. it/pdf/JRCReview. pdf.*

Lee, K. R., Kozukue, N., Han, J. S., Park, J. H., Chang, E. Y., Baek, E. J., Friedman, M. (2004). Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon

(HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10): 2832-2839.

Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M. and Schell, J. (1982). Broad-host-range cloning vectors derived from the W-plasmid Sa. *Gene*, 19(3): 361-364.

Lokossou, A. A., Park, T. H., van Arkel, G., Arens, M., Ruyter-Spira, C., Morales, J., Jacobsen, E. (2009). Exploiting knowledge of R/Avr genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(6): 630-641.

MacKerron, D., Jefferies, R. (1988). The distributions of tuber sizes in droughted and irrigated crops of potato. I. Observations on the effect of water stress on graded yields from differing cultivars. *Potato Research*, 31(2): 269-278.

Mafra, I., Silva, S. A., Moreira, E. J.M. O., Silva, C. S. F., da Beatriz, M. and Oliveira, P. P. (2008). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, 19(12): 1183–1190. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.004.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring harbor laboratory Cold Spring Harbor, NY.

McCue, K. F., Shepherd, L. V., Allen, P. V., Maccree, M. M., Rockhold, D. R., Corsini, D. L., Belknap, W. R. (2005). Metabolic compensation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in transgenic potato tubers: using reverse genetics to confirm the in vivo enzyme function of a steroidal alkaloid galactosyltransferase. *Plant science*, 168(1): 267-273.

Mckenzie, M. J., Chen, R. K., Harris, J. C., Ashworth, M. J. and Brummell, D. A. (2013). Post- translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold- induced sweetening of potato tubers. *Plant, cell & environment*, 36(1): 176-185.

Meriç, S. (2012). Mısır İçeren Gıda Ve Yem Çeşitlerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarla ilgili Genetik Analizler. yüksek lisans, istanbul üniversitesi moleküler biyoloji ve genetik, istanbul.

Michelini, E., Simoni, P., Cevenini, L., Mezzanotte, L. and Roda, A. (2008). New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3): 355-367.

Monneveux, P., Ramírez, D. A. and Pino, M. T. (2013). Drought tolerance in potato (S. tuberosum L.): Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant science*, 205: 76-86.

Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z. and Murata, N. (1995). Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14): 6219-6223.

Mutlu, Ş. (2016). Piyasada satışa sunulan cips ve gevreklerde gdo varlığının araştırılması. Namık Kemal Üniversitesi

Muwonge, A. (2005). Detectıon Of Genetıcally Modıfıed Potatoes By The Polymerase Chaın Reactıon. . Mıddle East Technıcal Unıversıty.

Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuán, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant physiology*, 132(3): 1272-1282.

Niederhauser, J. S. (1953). *Resistance of Solanum species to Phytophthora infestans in Mexico*. Retrieved from.

Nottingham, S. (2003). *Eat your genes: how genetically modified food is entering our diet*. Zed book.

Onaran, H., Ünlenen, L. ve Doğan, A. (2000). Patates Tarımı, Sorunları ve Çözüm Yolları. *Patates Araştırma Enstitüsü, Niğde.*

Öktem, A. (2004). Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Yetiştirilmesi: Bitki Biyoteknolojisi II–Doku Kültürü ve Uygulamaları.

Özcan, S. ve Sancak, C. (2015). Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Tarımsal Üretime Etkileri. Retrieved from Retrieved from www.tarbiyotek.orgwww.cengizsancak.com.

Özdemir, O. (2007). Gen Kaynaklarının Sürdürülebilirliği Açısından GDO'ların Sosyoekonomik Etkileri. *Ankara Biyoteknoloji Günleri: Biyoteknoloji, Biyogüvenlik ve Sosyo-Ekonomik Yaklaşımlar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara*

Özgen, Ö., Roğlu, H. E., Yildiz M., Taş, U. A. G. A. S. ve Purutçuoğlu, U. A. G. E. (2007). Tüketiciler Ve Modern Biyoteknoloji: Model Yaklaşimlar.

Öztürk, D. (2011). Mısır Kökenli Gıdalarda Yabancı Gen Taranması. yüksek lisans yayınlanmamış tez, istanbul üniversitesi Moleküler biyoloji ve genetik, istanbul.

Paal, J., Henselewski, H., Muth, J., Meksem, K., Menéndez, C. M., Salamini, F., Gebhardt, C. (2004). Molecular cloning of the potato Gro1- 4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode Globodera rostochiensis, based on a candidate gene approach. *The Plant Journal*, 38(2): 285-297.

Pandey, P., Senthil-Kumar, M. and Mysore, K. S. (2015). Advances in plant gene silencing methods. *Plant Gene Silencing: Methods and Protocols*: 3-23

Papp, I., Dulai, S. and Koncz, C. (2004). A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought. *Plant molecular biology*, 55(5): 679-686.

Pel, M. A., Foster S J, Park T-H, Rietman H, van Arkel G, Jones J D, . . . Van der Vossen E A (2009). Mapping and cloning of late blight resistance genes from Solanum venturii using an interspecific candidate gene approach. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5): 601-615.

Persley, G. J. (1990). *Beyond Mendel's garden: biotechnology in the service of world agriculture*. Cab International.

Petersson, E. V., Arif U, Schulzova V, Krtková V, Hajšlová J, Meijer J, . . . Sitbon F (2013). Glycoalkaloid and calystegine levels in table potato cultivars

subjected to wounding, light, and heat treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24): 5893-5902.

Pieczynski, M., Marczewski, W., Hennig, J., Dolata, J., Bielewicz, D., Piontek, P., Konopka- Postupolska, D. (2013). Down- regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought- tolerant potato. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4): 459-469.

Primrose, S. B., Twyman, R. (2013). *Principles of gene manipulation and genomics*.

Ron, M., Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell*, 16(6): 1604-1615.

Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal*, 32(6): 1067-1075.

Schaub, P., Al-Babili, S., Drake, R. and Beyer, P. (2005). Why is golden rice golden (yellow) instead of red? *Plant physiology*, 138(1): 441-450.

Sheehy, R. E., Pearson, Judith., Brady, Colin, J., Hiatt, William, R. (1987). Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Molecular and General Genetics MGG*, 208(1): 30-36.

Sindhu, A. S., Maier, T. R., Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Davis, E. L. and Baum, T. J. (2008). Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. *Journal of Experimental Botany*, 60(1): 315-324.

Singh, N. and Rajini, P. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry*, 85(4): 611-616.

Somma, M. and Querci, M. (2010a). 11, Lüxembourg.

Somma, M. and Querci, M. (2010b). *Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma analizleri*, Bölüm 6 (s11), Lüxembourg.

Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Buell, C. R. (2003). Gene RB cloned from Solanum bulbocastanum confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16): 9128-9133.

Soykan, S. (2007). Avrupa Birliği ve Ülkemiz Mevzuatlarında Biyogüvenlik. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Ankara,* 170.

Sönmezalp, C. Z. (2004). Detection of Genetically Modified Insect Resistant Tomato via polymerase chain reaction. Middle East Technical University.

Spooner, D.M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R. and Bryan, G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41): 14694-14699.

Stevens, L. H. and Davelaar, E. (1997). Biochemical potential of potato tubers to synthesize blackspot pigments in relation to their actual blackspot

susceptibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 45(11): 4221-4226.

Şehirali, S. ve Özgen, M. (1988). Bitki Islahı. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,* 1059.

Şen, S. ve Altınkaynak, S. (2014). Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve potansiyel sağlık riskleri. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 18(1): 31-38.

Terry, C. F., Harris, N. and Parkes, H. C. (2002). Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International*, 85(3): 768-774.

Thompson, M. D., Thompson, H. J., McGinley, J. N., Neil, E. S., Rush, D. K., Holm, D. G. and Stushnoff, C. (2009). Functional food characteristics of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.): phytochemical composition and inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced breast cancer in rats. *Journal of Food Composition and Analysis,* 22(6): 571-576.

Topal, Ş. (2006). *Biyogüvenlik ve biyoteknoloji*. Cemturan Ofset Matbaası, s 43-44, İstanbul.

TÜİK, (2015a). Bitkisel üretim istatistikleri, Yumru ve Kök Sebzeler Retrieved from http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001.

Türkiye Cumhuriyeti Biyogüvenlik Kanunu: Kanun numarası 5977. Resmi Gazete, 27533/Tarih:26.03.2010, (2010).

Tüysüzoğlu, B. ve Gülsaçan, M. (2004). Türkiye'de GDO. *Bilim ve Teknik,* 443: 36.

Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology,* 17(2): 147-154.

TZOB, (26.10.2014). Patates hasadı. Retrieved from http://www.tzob.org.tr/Bas%C4%B1nOdas%C4%B1/Haberler/ArtMID/470/ArticleID/1215/Patates-hasad%C4%B1.

USDA-APHIS, (2015). Petitions for determination of nonregulated status. Retrieved from http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/petitions_table_pending.shtml.

Uzogara, S. G. (2000). The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnology advances,* 18(3): 179-206.

Van Der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B. T. L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Allefs, S. (2003). An ancient R gene from the wild potato species Solanum bulbocastanum confers broad- spectrum resistance to Phytophthora infestans in cultivated potato and tomato. *The Plant Journal,* 36(6): 867-882.

Van Eck, J., Conlin, B., Garvin, D., Mason, H., Navarre, D. and Brown, C. (2007). Enhancing beta-carotene content in potato by RNAi-mediated silencing of the beta-carotene hydroxylase gene. *American Journal of Potato Research,* 84(4): 331-342.

Visser, R., Somhorst, I., Kuipers, G., Ruys, N., Feenstra, W. J. and Jacobsen, E. (1991). Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch

synthase in potato by antisense constructs. *Molecular and General Genetics MGG,* 225(2): 289-296.

Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. and Nester, E. (1975). Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Bacteriology,* 123(1): 255-264.

Weisz, R., Kaminski, J. and Smilowitz, Z. (1994). Water deficit effects on potato leaf growth and transpiration: utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops. *American Journal of Potato Research,* 71(12): 829-840.

Wulff, E., Torres, S. and Vigil, E. G. (2002). Protocol for DNA extraction from potato tubers. *Plant molecular biology reporter,* 20(2): 187-187.

Yanaz, S. (2003). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Konusu ve Cartagena Biyogüvenlik Protokolü. *Dış Ticaret Dergisi,* 28: 116-126.

Yang, L., Shen, H., Pan, A., Chen, J., Huang, C. and Zhang, D. (2005). Screening and construct- specific detection methods of transgenic Huafan No 1 tomato by conventional and real- time PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 85(13): 2159-2166.

Ye, J., Shakya, R., Shrestha, P. and Rommens, C. M. (2010). Tuber-specific silencing of the acid invertase gene substantially lowers the acrylamide-forming potential of potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 58(23): 12162-12167

Yılmaz, F. (2014). Bitkisel Üretimde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünleri ile Biyogüvenlik. Uzmanlık Tezi Kalkınma Bakanlığı, Ankara.

Yoke-Kqueen, C., Yee-Tyan, C., Siew-Ping, K. and Son, R. (2011). Development of multiplex-PCR for Genetically Modified Organism (GMO) detection targeting EPSPS and Cry1Ab genes in soy and maize samples. *International Food Research Journal,* 18: 515-522.

Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. and Ishikawa, M. (2004). The Arabidopsis cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *Journal of Virology,* 78(12): 6102-6111.

Yuan, B. Z., Nishiyama, S. and Kang, Y. (2003). Effects of different irrigation regimes on the growth and yield of drip-irrigated potato. *Agricultural water management,* 63(3): 153-167.

Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. *Journal of molecular biology,* 86(1): 109IN19117-116127.

Zhang, S. Z., Ben- Peng, Y., Feng, C. L. and Tang, H. L. (2005). Genetic transformation of tobacco with the trehalose synthase gene from Grifola frondosa Fr. enhances the resistance to drought and salt in tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology,* 47(5): 579-587.

Zülal, A. (2003). Gen aktarımlı tarım ürünleri. *Bilim ve Teknik Dergisi,* 426: 38-43.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Beyhan Demirhan
Doğum Tarihi ve Yeri	10.06.1981, Ünye
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dili	İngilizce
E-mail	idemirhan@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise	Ünye Yabancı Dil Ağırlıklı Lise (2000)
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Amasya Eğitim Fakültesi İlköğretim Fen Bilgisi Öğretmenliği (2004)
Önlisans	Anadolu Üniversitesi**,** Adalet Meslek Yüksekokulu (2012)
Yüksek lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilin Dalı (2015-2017)

Yayınlar

Arvas Y.E., Durmuş M., **Demirhan B**., Kaya Y., (2017). Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Biyolojik Çeşitliliğe Etkisi. I. Uluslararası Organik Tarım ve Biyoçeşitlilik Sempozyumu 27-29 Eylül Bayburt (ss. 65)